



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUANA CELINA SERAPHIM CUNHA

Avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* e sua modulação na
adesão e infecção de macrófagos humanos

Aracaju, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUANA CELINA SERAPHIM CUNHA

Avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *Leishmania infantum* e sua modulação
na adesão e infecção de macrófagos humanos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr Roque Pacheco de Almeida

Aracaju, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C972a	<p>Cunha, Luana Celina Seraphim</p> <p>Avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de <i>Leishmania infantum</i> e sua modulação na adesão e infecção de macrófagos humanos / Luana Celina Seraphim Cunha ; orientador Roque Pacheco de Almeida. – Aracaju, 2016.</p> <p>90 f.: il. Color.</p> <p>Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.</p> <p>1. Leishmaniose Visceral. 2. Infecção. 3. Macrófago. 4. Enzima. I. Almeida, Roque Pacheco de, orient. II. Título.</p> <p>CDU 616.993.161</p>
-------	---

LUANA CELINA SERAPHIM CUNHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Data da aprovação: _____

Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida (Orientador)

Universidade Federal de Sergipe

Profª. Drª. Tatiana Rodrigues De Moura (Examinador I)

Profª. Drª Roberta Pereira Miranda Fernandes (Examinador II)

Profª. Drª. Nalu Teixeira De Aguiar Peres (Examinador III)

Profª. Drª Amélia Maria Ribeiro de Jesus (Examinador IV)

PARECER

Dedico este trabalho a todos que
compartilharam das alegrias, das
tristezas e dos esforços desses
quatro anos e assim contribuíram
com mais uma vitória na minha
vida.

Agradecimentos

A elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e estresse seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha imensa gratidão!

Em primeiro lugar, agradeço a Deus expresso na forma da mãe natureza e todas as suas leis, que nos permite enquanto curiosos investigadores, conhecer como foi criado esse fantástico e grandioso projeto que é a vida.

Ao povo brasileiro por ter custeado meus estudos, desde os primeiros anos.

A Capes e ao CNPq e a Fapitec pelo financiamento do projeto e a valorosa bolsa de estudos.

Professor Dr. Roque Pacheco de Almeida e Professora Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus exemplos de cientistas, médicos e formadores de profissionais para lidar com problemas que atingem a gente brasileira. Minha admiração por serem agentes transformadores da realidade, através de trabalho, dedicação e amor. Professor Roque não foi só um orientador, mas um amigo com quem aprendi muito a me direcionar dentro de um laboratório de pesquisa, tanto no que diz respeito ao imprescindível bom convívio com os colegas quanto à conduta dos trabalhos realizados.

A Professora Dra. Juliana Fietto Rangel, minha primeira orientadora, exemplo de cientista, educadora e curiosa da vida, obrigada por me iniciar nessa linha de pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

A Professora Dra. Tatiana Moura Rodrigues, pelas discussões científicas, ensinamentos de bancada, planejamento de experimentos, ideias e sugestões.

Aos meus pais pela formação como ser humano, por me ensinarem a olhar para as coisas do mundo sempre com o coração aberto e mente livre. Devo a vocês tudo que sou!

Ao meu irmão André pela convivência e companheirismo nesses anos todos, e torcer por mim sempre!

A Mel por me fazer feliz e capaz de realizar coisas, pelo companheirismo, pela cumplicidade e amor. Por me ensinar a fazer fabulosas viagens sobre meu tapete mágico de yoga.

A Kiki por todos os momentos felizes, pela amizade e amor, companheira de muitas aventuras!

Pela participação direta e de muita importância na realização de grande parte desse trabalho, agradeço à Meirielly Lima Almeida pela força, sem você não conseguiria chegar até o fim!

Aos amigos Shirlei Otacílio, Rodrigo Cazzaniga e agora o bebê Érico, pessoas do Bem! Obrigada pela amizade, pelos bons papos, pelas e valiosas dicas, e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Márcio Bezerra, Fabrícia Alvise e Nalu Peres que não tenho palavras para agradecer a ajuda sempre com boa vontade. Muito obrigada!!!

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) em especial o Laboratório de Biologia Molecular (LBM) pelo ambiente criativo, agradável e amigável que podemos desfrutar. Aos colegas Aline Barreto, Lucas Magalhães, Micheli L. B. Santos, Mônica Rueda, Ricardo Louzada, Roseane Nunes, Thaís Carvalho, com quem compartilhei os entraves, percalços e também as glórias desse projeto, enfim obrigada por tudo!

A todos os meus amigos pelo colorido que dão à minha vida, temperando o cotidiano, fazendo cada momento valer a pena.

Gratidão de Coração!



Svásti Páthah

Mantra de Invocação da Felicidade

Om

Que haja felicidade para todas as pessoas.

Que os governantes governem a terra com retidão e justiça.

Que haja sempre o bem.

Que as chuvas cheguem no momento adequado; que a terra seja fértil,

Que o país esteja em paz; que os sábios estejam seguros.

Que todos tenham saúde. Que todos vivam felizes.

Que todos vivam em paz.

Que todos vivam em plenitude. Que todos sejam felizes.

Que todos permaneçam livres da doença.

Que todos possam se beneficiar da prosperidade.

Que ninguém experimente tristeza.

Que todos os seres em todos os lugares sejam livres e felizes.

Resumo

A Leishmaniose visceral é uma doença negligenciada causada, no Brasil, pelo protozoário *Leishmania infantum*. A atividade ecto-nucleotidásica descrita em vários parasitos incluindo *Leishmania sp* está associada à nutrição, adesão, infecção e virulência destes, funcionando como um mecanismo molecular capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, favorecendo a progressão da doença. As ecto-nucleotidases da família E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou di-fosfatados em seus produtos monofosfatados. O metabolismo extracelular destes nucleotídeos tem um papel importante na infecção por *L. infantum* e outros patógenos intracelulares. Estes nucleotídeos extracelulares são potentes sinalizadores envolvidos em vários processos celulares, incluindo a sinalização purinérgica que está relacionada à modulação da resposta imune. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da atividade ecto-nucleotidásica em *L. infantum* na adesão e infecção de macrófagos humanos. Avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de parasitos crescidos em meio depletado de purina, meio enriquecido com adenosina, incubados previamente com inibidor da atividade NTPDásica, ou na presença do anticorpo Anti E-NTPDase 1 e investigar os efeitos desses tratamentos na adesão e infecção desses parasitos em macrófagos humanos. A atividade ecto-nucleotidásica dos parasitos foram avaliadas em quatro condições diferentes: (1) na meio depletado de purina, (2) meio enriquecido com adenosina, (3) com o inibidor da atividade ecto-nucleotidásica, e (4) incubada com anticorpo anti-E NTPDase 1. foram investigados os efeitos desses tratamentos sobre a adesão e infecção destes parasitos em macrófagos humanos. Imunodetectamos a presença de E-NTPDases presentes na membrana de *L. infantum*, e comparamos a atividade ecto-nucleotidásica de diferentes cepas de *L. infantum*. A atividade ecto-nucleotidásica, é modulada de acordo com a disponibilidade de adenosina do meio, parasitos cultivados em meio depletado de purina apresentaram o aumento da capacidade hidrolítica de nucleotídeos, e maior capacidade infectiva, os parasitos cultivados em meio suplementado com adenosina apresentaram uma menor atividade ecto-nucleotidásica e uma redução de 30% na capacidade infectiva. O aumento da atividade ecto-nucleotidásica levou a um aumento na adesão em células não fagocíticas. As enzimas E-NTPDases estão presentes na membrana de *L. infantum*. Concluímos que atividade ecto-nucleotidásica está associada a maior capacidade de adesão e infecção destes parasitos *in vitro*.

Abstract

Visceral leishmaniasis is a neglected disease caused by *Leishmania infantum* in Brazil. The Ecto-NTPDase activities, described in various parasites including *Leishmania*, is involved in adhesion, infection and virulence of these parasites, functioning as a molecular mechanism able to modulate the host immune response and promoting the disease progression. E-NTPDases are enzymes that hydrolyze nucleotides tri and/or di-phosphate into monophosphate products. The extracellular metabolism of these nucleotides has an important role in infection by *L. infantum* and other intracellular pathogens. These nucleotides are powerful extracellular signals involved in various cellular processes, which are part of the purinergic signalling that modulates the immune response. The objective of this study was to evaluate the role of ecto-NTPDase activities in adherence and infection of *L. infantum* in human macrophages. The ecto-NTPDase activities of parasites were evaluated in four different media or conditions: (1) purine-depleted, (2) adenosine-enriched, (3) with inhibitor of ecto-NTPDase activities, and (4) with anti-E antibody NTPDase 1. The effects of these treatments on the adhesion and infection of these parasites in human macrophages were investigated. Immunolocalization of the E-NTPDase in the membrane of *L. infantum* was also evaluated. The ecto-nucleotidase activity is modulated according to the availability of adenosine in the medium. Parasites cultivated in a purine-depleted medium showed increased hydrolytic capacity of nucleotides and higher infectivity. Parasites grown in adenosine-enriched medium had lower ecto-nucleotidase activity and infectivity. Growing parasites with an inhibitor of Ecto-NTPDase activities led to an increase in the adherence of *Leishmania* to non-phagocytic cells. E-NTPDase enzymes responsible for the hydrolysis of nucleotides are present in the membrane of *L. infantum*. The higher hydrolysis capacity is associated with increased adhesion capacity and infection of these parasites in human macrophages.

Keywords: Ecto-NTPDase activities, E-NTPDase, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, extracellular nucleotides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica de <i>L. infantum</i>	37
Figura 2. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica altera a capacidade infectiva de <i>L. infantum</i> em macrófagos humanos	38
Figura 3. Influência da Adenosina na Atividade Ecto-Nucleotidásica	39
Figura 4. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica pela adenosina e seus efeitos na infecção de macrófagos humanos por <i>L. infantum</i>	40
Figura 5. Efeito do ATP na infecção de macrófagos humanos por <i>L. infantum</i>	41
Figura 6. Atividade Ecto-nucleotidásica de <i>L. infantum</i> na presença de anticorpo anti E-NTPDase-1.	42
Figura 7. Influencia do anticorpo anti E-NTPDase-1 na infecção de macrófagos Humanos por <i>L. infantum</i> .	43
Figura 8. Imunodetecção de E-NTPDase 1 e 2 em extrato bruto de <i>L. infantum</i>	44
Figura 9. Microscopia confocal demonstrando a presença de E-NTPDases 1 e E-NTPDases 2 na membrana de promastigotas de <i>L. infantum</i>	46
Figura 10. Efeito da suramina no crescimento de <i>L. infantum</i>	47
Figura 11. Atividade ecto-nucleotidásica de <i>L. infantum</i> de parasitos cultivados na presença de inibidor suramina por 72h.	48
Figura 12. Influencia da atividade ecto-nucleotidásica de <i>L. infantum</i> na adesão de células não fagocíticas	49
Figura 13. Comparação da atividade ecto-nucleotidásica (E-NTPDásica e 5' nucleotidásica) das cepas LHVSE 09, LVHSE 17, LVHSE 23, e LVHSE 49	50

Lista de Abreviaturas

Ado – adenosina
ADO: adenosina
ADP – Adenosina Difosfato
ADP: adenosina 5'-difosfato
ADPe – ADP extracelular
AMP – Adenosina Monofosfato
AMP: adenosina 5'-monofosfato
AMPC: adenosina 5' - monofosfato cíclico
Arg1 - Arginase 1
ATP – Adenosina Trifosfato
ATP: adenosina 5'-trifosfato
ATPe – ATP extracelular
CD 39 – E-NTPDases, Apyrases
CD 73- 5' Nucleotidase
DAMP (padrão moleculares associados a dano)
DTH - Hipersensibilidade do tipo tardio
Ecto-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase
E-NTPDase: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
EROS – Espécies reativas de oxigênio
IFN- γ – Interferon gama
IL- Interleucinas
LVHSE 09 - Leishimania Visceral Humana Sergipe 09
LVHSE 17 - Leishimania Visceral Humana Sergipe 17
LVHSE 23 - Leishimania Visceral Humana Sergipe 23
LVHSE 49 - Leishimania Visceral Humana Sergipe 49
MMAPs - padrões moleculares associados a patógenos
MO – Microscopia Óptica
NO - Óxido Nítrico
PBS- Tampão fosfato salino
PBS-T - Tampão fosfato salino com detergente Twinn 20
Pi – fosfato inorgânico

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFB – soro fetal bovino

TGF- β - Fator de crescimento e transformação-beta

TH1 Resposta de células T auxiliares tipo 1

TH17 resposta de células T auxiliares tipo 17

TH2 Resposta de células T auxiliares tipo 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. ASPECTOS GERAIS	3
2.2. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	5
2.3. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	8
2.4 ATP E ADENOSINA IMPORTANTES MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE	10
2.5 ENZIMAS QUE CONTROLAM O METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES	12
2.6. RECEPTORES PURINÉRGICOS E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	14
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVO GERAL	22
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1. PARASITOS	23
5.2. MEIO DE CULTIVO DE <i>L. infantum</i> .	23
5.3. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES FAGOCÍTICAS.	24
5.5. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM <i>L. infantum</i>	25
5.11. IMUNODETECÇÃO DE E-NTPDASE-1 E E-NTPDASE-2 EM EXTRATO BRUTO DE <i>L. infantum</i>	30
5.12. DETECÇÃO E-NTPDase EM <i>L. infantum</i> POR MICROSCOPIA CONFOCAL	31
5.13.2. ADESÃO DE <i>L. infantum</i> EM CÉLULA NÃO FAGOCÍTICA	33
5.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6. RESULTADOS	35
6.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA DE <i>L. infantum</i> CULTIVADAS EM MEIO DEPLETADO DE PURINA E NA PRESENÇA DE INIBIDOR DE E-NTPDASE.	35

6.2. INFLUÊNCIA DA ADENOSINA NA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR <i>L. infantum</i> .	37
6.3. EFEITO DO ATP NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR <i>L. infantum</i> .	39
6.4. PARTICIPAÇÃO DO ANTICORPO ANTI E-NTPDASE-1 HUMANO NA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR <i>L. infantum</i> .	40
6.5. IMUNODETECÇÃO DAS ISOFORMAS E-NTPDASE-1 E E-NTPDASE-2 EM <i>L. infantum</i>	42
6.6. MICROSCOPIA CONFOCAL DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE E-NTPDASES 1 E 2 NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i> .	43
6.7. PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA NA ADESÃO DE <i>L. infantum</i> EM CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS.	46
6.8. Comparação da atividade ecto-nucleotidásica em diferentes cepas de <i>L. Infantum</i> isoladas de pacientes com LV	48
7. DISCUSSÃO	50
8.1. CONCLUSÃO GERAL	61
9. PERSPECTIVAS	62
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas e parasitárias constituem o principal problema de saúde pública em áreas tropicais do planeta. A leishmaniose visceral (LV) atinge cerca de 65 países, com incidência estimada de 500 mil novos casos e 59 mil óbitos anuais. No Brasil, é causada pelo protozoário *Leishmania infantum infantum* e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, sendo o cão considerado a principal fonte de infecção no meio urbano. É uma doença grave e fatal caso não tratada, tem letalidade de cerca de 5%(Werneck 2010).

Medidas de controle como imunoprevenção e/ou imunoterapia são necessárias, a fim de que ocorra o controle mais eficaz da doença. Leishmaniose visceral é caracterizada por uma diminuição da resposta imune celular ao antígeno de leishmania, associada à elevada detecção de IL-10 em Células T CD4+, em Células T regulatórias e no plasma/soro, favorecendo a proliferação do parasita e a gravidade da doença (Nylen, Maurya et al. 2007). A resposta imunológica do paciente tem papel fundamental no prognóstico desta infecção crônica, a qual pode evoluir para a forma clássica da leishmaniose visceral (LV) (McCall 2013).

Diversos fatores são determinantes dessa evolução da infecção, entre eles os fenômenos iniciais da interação entre o parasito e hospedeiro, tais como moléculas liberadas no meio extracelular por estas células da resposta imune inata. Nesse contexto, a liberação de nucleotídeos no meio extracelular exerce influencia nesta interação, bem como enzimas que participam na degradação desses nucleotídeos e seus receptores.

Um dos mais importantes mediadores da resposta imune em caso de dano celular é a adenosina trifosfato extracelular (ATPe) e seus metabolitos, ADP e adenosina. Dependendo da concentração, o ATPe pode atuar como um imunoestimulante ou imunossupressor da resposta imune, enquanto a adenosina geralmente desencadeia respostas imunossupressoras potentes. Os níveis de ATP extracelular e da adenosina são detectados e transduzidos por receptores purinérgicos do tipo P2 e P1, respectivamente. Assim a sinalização purinérgica afeta todos os aspectos da imunidade e inflamação (Di Virgilio and Vuerich 2015).

Outro elemento importante no metabolismo de nucleotídeos celulares são as enzimas E-NTPDases também conhecidas como nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases da família das ecto-nucleotidases, também chamadas de apyrases.

O interesse nessas enzimas se baseia em vários dados obtidos na literatura relacionando a participação de ecto-nucleotidases, na interação parasito-hospedeiro, a exemplo da virulência, adesão, infectividade e aquisição de purinas em vários protozoários, com destaque para tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de chagas, e *Leishmania* sp, causador das leishmanioses (Fietto, DeMarco et al. 2004, Maioli, Takane et al. 2004, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

Alguns trabalhos mostram de forma clara uma correlação entre a hidrólise de ATP e um dado efeito biológico na interação parasito-hospedeiro, como por exemplo, a inibição dessa enzima em *T. cruzi* leva a uma redução de 50% desta infecção *in vitro* (Silverman, Qi et al. 1998, Sansom, Newton et al. 2007, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, Sansom, Robson et al. 2008, Santos, Possa et al. 2009).

Atividades dessas enzimas foram demonstradas em *Leishmania tropica* e *Leishmania amazonensis* (Meyer-Fernandes, Dutra et al. 1997, Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001), e mais recentemente em *L. infantum* (Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014). Estes estudos associam a presença genética, a expressão gênica e/ou a atividade enzimática de ecto-nucleotidases desses parasitos com a virulência, adesão celular, saída do parasito da célula infectada, além do controle da concentração de nucleotídeos das células hospedeiras e do meio extracelular.

Além disso, estas enzimas parecem favorecer a diminuição de expressão de Interferon- γ e aumento da expressão de interleucina-10, modulando a resposta imune do hospedeiro, e favorecendo a sobrevivência do parasito. (DeMarco, Kowaltowski et al. 2003, Maioli, Takane et al. 2004, de Souza, de Assis et al. 2010, Gomes, de Carvalho et al. 2015).

Neste contexto, o presente trabalho propõe a avaliar a influência da atividade E-NTPDásica na adesão e infecção de macrófagos humanos por *Leishmania infantum*. Nossa hipótese é que enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, principalmente na degradação do ATP extracelular e produção de adenosina, presentes na membrana de *L. Infantum* estão associadas à adesão e maior capacidade infectiva, favorecendo o parasito nos momentos iniciais da infecção, por modular a resposta imune do hospedeiro resultando no estabelecimento da infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios, da família Tripanossomatidae, da ordem Kinetoplastidae, do gênero *Leishmania*. A infecção por *Leishmania* resulta em distintas situações clínicas e imunopatológicas: A Leishmaniose visceral LV (forma sistêmica mais grave da doença), Leishmaniose cutânea (a forma mais comum), e a leishmaniose mucocutânea. A maioria das espécies que causam leishmaniose visceral (LV) pertence ao complexo *L. donovani*: *L. donovani* (sin. *Leishmania archibaldi*) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (Lukes, Mauricio et al. 2007, W.H.O. 2015).

Atualmente são conhecidas mais de 90 espécies de vetores flebotomíneos capazes de transmitir parasitas de *Leishmania* (W.H.O. 2015). No Brasil duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Lainson 2005). No ambiente silvestre, os reservatórios de *Leishmania* são principalmente as raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*). O cão (*Canis familiaris*) é aceito como o principal reservatório doméstico da infecção, mas o verdadeiro papel do homem na transmissão da doença ainda não está totalmente definido (Costa 2000, Costa 2002, Costa 2005).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula na pele do hospedeiro vertebrado as formas infectantes do parasito, denominada promastigota metacíclica, que apresentam formato alongado, alta motilidade com flagelo livre evidente. Uma vez no tecido do hospedeiro vertebrado, estes são reconhecidos e englobados por fagócitos mononucleares residentes e por mononucleares recém-recrutados. Uma vez fagocitados, há a formação do fagolisossoma, no qual os parasitos assumem sua forma multiplicativa chamada de amastigota, caracterizada pelo formato ovóide, imóveis por não possuírem flagelo livre, que começam a se multiplicar por divisão binária levando ao rompimento da célula hospedeira, os parasitos recém-liberados podem infectar outros fagócitos em tecidos distantes.

O ciclo do parasito se reinicia com a ingestão de sangue pelos flebótomos contendo fagócitos infectados, a transição da forma amastigota para promastigota acontece no trato gastrointestinal do inseto vetor e posterior inoculação de promastigotas metacíclicas em vertebrados através da picada do vetor (Murray 2005, Bates 2007). A *Leishmania sp* é um parasito digenético, por apresentar duas formas evolutivas no seu ciclo de vida: uma forma extracelular, que é encontrado no intestino do hospedeiro invertebrado e uma forma intracelular, que parasita principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado (Bates 2007).

A LV é a forma mais grave da doença, se não tratada pode levar a óbito, constituindo um sério problema de saúde pública em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta, compondo o grupo das doenças negligenciadas (Rahman 1983, Thakur 1984, W.H.O 2002, Collins 2004, Desjeux 2004). Dados da Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 200.000 – 400.000 novos casos de VL ocorrem no mundo a cada ano. Mais de 90% dos casos novos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (W.H.O. 2015).

No Brasil, na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorria fora da Região Nordeste, mas em 2007, esta cifra chegou a 50%. Entre os anos de 2006 e 2008, a transmissão autóctone da LV foi registrada em mais de 1.200 municípios em 21 Unidades Federadas (Werneck 2010). Em 2013 foram notificados 3253 casos e a região Nordeste concentrou nesse mesmo ano 53,6% dos eventos. Ainda segundo dados do Ministério da Saúde (SVS/MS) a taxa de letalidade foi de 7,1% em 2013 [36]. Em Aracaju/SE, entre os anos de 2008 a 2013, notificou-se 369 casos e destes 157 foram confirmados, 104 ocorrendo em indivíduos do sexo masculino (SINAN/SES, 2014).

A leishmaniose visceral (LV) no passado era considerada como uma zoonose de caráter rural, mas atualmente está em um intenso processo de expansão para os centros urbanos, em função de mudanças ambientais como a domesticação do ciclo de transmissão, incursão das explorações agrícolas, assentamentos em áreas florestais, ações antrópicas, processos migratórios e adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* ao peridomicílio. A doença vem acometendo humanos e animais, principalmente os cães, que vivem no ambiente domiciliar e peridomiciliar. Apesar da captura de cães infectados, a prevalência da doença tem persistido elevada em diversas regiões (Jeronimo, Duggal et al. 2004, Costa, Tapety et al. 2007, W.H.O. 2015).

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde/MS (2009), a LV é classificada clinicamente em três períodos: inicial, de estado e final. O período inicial é caracterizado por febre com duração inferior a 4 semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Em áreas endêmicas, uma pequena parcela de indivíduos, geralmente crianças, pode apresentar quadro clínico discreto, com duração aproximada de 15 dias, que usualmente evolui para cura espontânea. A combinação de manifestações clínicas e alterações laboratoriais, que melhor caracterizam esta fase, é febre, hepatomegalia, hiperglobulinemia e velocidade de hemossedimentação alta. O período de estado caracteriza-se por febre irregular, caquexia, palidez cutâneo-mucosa e progressão da hepatoesplenomegalia, este intervalo apresenta um quadro clínico arrastado, geralmente com mais de 2 meses de evolução, na maioria das vezes associado ao comprometimento do estado geral do indivíduo. Atribui-se ao período final, febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) e edema dos membros inferiores, que pode evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nesses pacientes, o óbito geralmente é acompanhado de infecções bacterianas e/ou sangramentos.

2.2. INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

O flebótomo infectado com *Leishmania* ao efetuar o repasto sanguíneo, cria um poço de sangue na região intradérmica do hospedeiro vertebrado para que ele possa se alimentar. A lise celular gerada pelo dano tecidual causado durante esse processo enriquece o meio extracelular com moléculas provenientes do interior das células. A capacidade da *Leishmania sp.* de sobreviver no seu hospedeiro vertebrado ou invertebrado depende de sua capacidade de detectar e adaptar-se às alterações do microambiente (Belosevic M. 1989).

Uma das moléculas liberadas nos momentos iniciais da infecção é o ATP, que além do conhecido papel no metabolismo energético das células, quando liberado no meio extracelular por dano ou estímulo celular por ação de patógenos, é interpretado pelo sistema imune como um “sinal de perigo” e suas propriedades imunoestimulantes auxiliam na montagem de uma resposta pró-inflamatória contra o parasito (Di Virgilio 2007, Sansom, Robson et al. 2008). O ATP participa do

estabelecimento da inflamação, por uma combinação de ações via sinalização purinérgica. Entre elas, o ATP estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias INF- γ , IL-12 e TNF- α , além da liberação de histaminas por mastócitos, provocando a produção de prostaglandinas (Langston HP 2003 Mar 15, Di Virgilio and 2006).

Muitos patógenos, incluindo parasitos do gênero *Leishmania*, são capazes de realizar a conversão enzimática extracelular do ATP em seus produtos de metabolismo, dentre eles a adenosina, que é internalizada pelo protozoário e usada para a síntese de purinas, e mutação no parasito que por outro lado, a adenosina quando presente no meio extracelular, possui propriedades imunoregulatórias, capaz de inibir a resposta imune, favorecendo o estabelecimento do parasito (Meyer-Fernandes, Dutra et al. 1997, Silverman, Qi et al. 1998, Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, Sansom, Robson et al. 2008, Santos, Possa et al. 2009).

Alguns trabalhos têm sugerido a participação das E-NTPDases (da família CD39) e 5' nucleotidases na virulência de agentes patogênicos e na aquisição de purinas por estes parasitos, como por exemplo na Doença de Chagas (Bisaggio, Peres-Sampaio et al. 2003, Santos, Possa et al. 2009), Toxoplasmose (Asai, Miura et al. 1995) e Leishmaniose (de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008). Em *T. cruzi* já foi demonstrado que essas enzimas participam na infectividade e virulência, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. As cepas incubadas previamente com diferentes inibidores dessas enzimas apresentaram uma menor capacidade infectiva e também desenvolveram uma forma mais branda da doença em camundongos (Santos, Possa et al. 2009).

A importância dessas enzimas envolvidas no metabolismo extracelular de nucleotídeos nos momentos iniciais de uma infecção por diversos protozoários, incluindo *Leishmania sp*, na determinação do perfil clínico da doença foi bem demonstrado em diversos estudos (Belosevic M. 1989, Silverman, Qi et al. 1998, Santos, Possa et al. 2009, de Souza, de Assis et al. 2010, Marques-da-Silva, Chaves et al. 2011, Paletta-Silva and Meyer-Fernandes 2012).

Apesar de a leishmaniose visceral ser a segunda doença tropical com maior índice de mortalidade no mundo (Alvar 2012), curiosamente há uma prevalência do número de pacientes assintomáticos sobre os pacientes sintomáticos, chegando a

uma razão estimada de 18-1 entre a leishmaniose visceral subclínica e sintomática (Badaró 1986, Badaró 1986, Gardinassi 2014). Assim sendo, uma maior parte dos indivíduos infectados por espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose visceral, desenvolvem uma resposta imunológica efetiva, que culmina no controle do desenvolvimento da doença (McCall 2013).

O tropismo dos parasitos e o desenvolvimento da forma visceral da doença ainda são pouco conhecidos, após a inoculação das formas promastigotas através da picada do flebotomíneo, amastigotas livres foram detectadas na corrente sanguínea e poderiam chegar aos órgãos de filtração do sangue (de Souza EP 2001). Alternativamente, a eventual propagação para órgãos viscerais poderia envolver o movimento de células infectadas. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da infecção em *L. major* (Peters, Egen et al. 2008, Peters NC 2009, Thalhoffer 2011). Neutrófilos infectados ou parasitas livres são, em seguida, captados por células dendríticas e macrófagos, que migram para os linfonodos a partir do local da picada (Ribeiro-Gomes FL 2012). No entanto, a via utilizada pelas células infectadas para eventualmente alcançar os órgãos viscerais continua a ser mal compreendida (McCall 2013).

Variações nos quadros clínicos da doença sugerem a existência de uma diferenciação espécie-específica na capacidade de parasitos do gênero *Leishmania* causar lesões no hospedeiro. Tais variações na virulência podem estar associadas, no entanto, à presença de outros fatores, tais como citocinas e quimiocinas, que possam ser diferencialmente produzidas em resposta à infecção, beneficiando ou não o estabelecimento do parasito. A identificação destes fatores que medeiam o desenvolvimento da leishmaniose visceral é altamente relevante para a compreensão da progressão da doença e mecanismos de sobrevivência do parasito (McCall 2013), a fim de desenvolver tratamentos mais efetivos e diminuir a incidência de novos casos.

2.3. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Por se tratar de um parasita intracelular obrigatório, de maneira geral a resposta imune gerada pelo hospedeiro contra *Leishmania* é predominantemente mediada pela resposta imune celular. A qualidade e a magnitude da resposta imune gerada são decisivas para levar ao controle ou ao estabelecimento da infecção e desenvolvimento de doença (McCall 2013). Vários fatores podem influenciar na resistência ou na susceptibilidade a leishmaniose, tais como a linhagem do parasita, genética do hospedeiro e fatores ambientais (Kumar R 2012).

Os momentos iniciais da infecção por *Leishmania* é marcado pelo recrutamento de células inflamatórias da imunidade inata para o local da infecção, e estas por sua vez promovem a indução da resposta adaptativa. A detecção inicial do parasito está relacionada ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores presentes nas diferentes células da imunidade inata como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e células assassinas naturais (NK) (Kumar R 2012).

Vários receptores Toll-like (TLR) tal como TLR2, TLR3 (Flandin JF 2006), TLR4, TLR9 (Mukherjee AK 2012) e TLR7 (Paun A 2011) estão envolvidos na detecção e reconhecimento de *Leishmania* por várias células imunes inatas. Este reconhecimento conduz à ativação de vias de sinalização intracelulares necessárias para o início das respostas inflamatórias e controle da proliferação do parasito pela resposta imune inata (Faria MS 2012).

A ativação de macrófagos é crucial para o desenvolvimento de uma resposta protetora para várias doenças incluindo leishmaniose. Durante a infecção por *Leishmania* em macrófagos, há liberação de IL-1 β que se liga ao receptor (IL-1R) ativando o inflamassoma Nlrp3 via MyD88, e desencadeia a indução da óxido nítrico sintetase (NOS2), mediando a produção de NO levando ao controle da replicação do parasito e sua eliminação (Lima-Junior DS 2013).

A resposta de padrão Th1 está classicamente associada com resistência à LV, sendo macrófagos ativados com IFN- γ ou TNF capazes de eliminar os parasitos da espécie *L. donovani* e *L. infantum* (Pearson 1981, Murray 1983). Esta resposta

envolve a liberação de IL-12 por células apresentadoras de antígeno nos linfonodos, levando à diferenciação de linfócitos TCD4+ naïves em linfócitos TCD4+ perfil Th1. Estes linfócitos TCD4 perfil TH1 por sua vez começam a produzir IFN- γ juntamente com as células NK (do inglês *Natural Killer*) e as T CD8+ que também são fontes importantes de IFN- γ (Scharton-Kersten 1995, Belkaid 2002). Por outro lado, o TNF α , produzido por macrófagos infectados, age em sinergismo com IFN- γ aumentando a ativação de iNOS (Liew 1990, Liew 1997), resultando na ativação de macrófagos e a produção de NO leishmanicida (Stanley AC 2007). A diminuição da produção de NO promove disseminação visceral após infecção cutânea com *L. major* em ratos (Diefenbach A 1999).

Em contrapartida, o desenvolvimento de uma resposta imune Th2 durante a infecção por *L. major*, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-10, e ausência de IL-12, confere suscetibilidade à infecção por reprimir a síntese das citocinas pró-inflamatória como TNF α e IL-1 (Sacks 2002). Ainda, a síntese de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-27, TGF- β (fator de crescimento e transformação-beta) e IL-10 suprimem a síntese de TNF α e IL-1 (Basu 2005, Osorio 2014).

Entretanto, a resposta Th1 / IFN- γ mediada por si só não é suficiente para proteger contra a doença, uma vez que pacientes com leishmaniose visceral são capazes de produzir IFN- γ em resposta ao antígeno de *Leishmania* (Singh OP 2012). A doença é fortemente relacionada com a produção de quantidades elevadas de IL-10, uma citocina imunossupressora que inibe funções imunes leishmanicidas (Verma S 2010, Singh OP 2012).

Estudos têm desafiado a simplicidade dos modelos de resposta imune do tipo Th1 contra o tipo Th2, e revelado outras complexidades na regulação de citocinas, mecanismos de resistência adquirida dos parasitos além de mecanismos de escape do sistema imune (Tripathi P. 2007). Para alguns casos de VL, parece que o resposta Imune é um tipo misto entre Th1 e Th2. Observou-se que em alguns pacientes com LV, a produção de citocinas Tipo Th1 não apresentavam níveis depletados, mas as células parecem ser insensíveis à estimulação com citocinas do tipo Th1 (Hailu A. 2005).

2.4 ATP E ADENOSINA IMPORTANTES MODULADORES DA RESPOSTA IMUNE

Durante muitos anos, o papel do ATPe na modulação do sistema imune não era uma ideia aceita no meio científico, entretanto três descobertas quebraram esse ceticismo. Primeiro, a clonagem e identificação em células do sistema imunológico do receptor purinérgico P2 e basicamente todos os seus subtipos; em segundo, a demonstração de que o ATP é liberado por células do sistema imunológico; e finalmente, o terceiro, que esses mediadores podem ser hidrolisados por ectonucleotidases específicas gerando derivados fosfolipídicos imunossupressivos. Na atualidade, está claro que a rede de sinalização purinérgica é um componente imunoregulatorio fundamental (Di Virgilio and 2006).

Por conseguinte, não é uma surpresa que o ATP seja um dos maiores representantes dos DAMP (padrão moleculares associados a dano), sendo um potente sinalizador de dano celular. Além disso, o ATP é altamente solúvel em água, e, portanto, facilmente difusível no ambiente extracelular aquoso, e rapidamente degradado por uma bateria de nucleotidases (Yegutkin 2014). Em adição a esta ideia, todas as células eucarióticas expressam receptores específicos para o ATP extracelular (Burnstock 2014).

Em tecidos saudáveis o ATP é quase exclusivamente intracelular, as concentrações extracelulares estão em níveis basais praticamente insignificantes (entre a 10–100 nM). Pode-se supor que, nestas condições, a maioria, se não todos os receptores P2 estão inativos e assim sinalizações purinérgicas ATP-dependentes estão em níveis basais. Os níveis de ATP extracelular (ATPe), mantidos baixo ou próximo de zero no espaço pericelular por ectoenzimas, é crucial para evitar a ativação de receptores P2. Para esta finalidade, a atividade de ecto-ATPases da membrana plasmática da família das E-NTPDase como CD39, por exemplo, é de particular importância (Dwyer, Deaglio et al. 2007).

Sob determinadas circunstâncias, tais como infecção por patógenos, o ATP pode servir como um sinal de perigo agudo quando liberado no meio extracelular em médias ou altas concentrações. O resultado pode ser bastante diferente quando as células são expostas de forma intermitente, lenta e crônica em níveis extracelulares de ATP. Nesta condição, os efeitos do ATP são muito mais sutis e dependendo das células que são estudadas, este nucleotídeo leva as respostas imunes a evoluir no

sentido da tolerância em vez de reatividade celular. Os papéis dualísticos dos mediadores imunes são bem conhecidos, e até mesmo o ATP pode se comportar como um clássico mediador da inflamação e imunidade (Di Virgilio, Boeynaems et al. 2009).

O ATPe e a adenosina são moléculas mediadoras importantes para células imunes, dependendo da concentração dessas moléculas, elas podem se ligar a um ou outro subtipo de receptor purinérgico, conduzindo, dessa maneira a diferentes respostas fisiológicas (Bours, Swennen et al. 2006). Além disto, o acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência, pois apresenta efeitos tóxicos frente ao desenvolvimento dos linfócitos. Sabe-se também que a adenosina e seu produto de degradação, a inosina são reguladores do processo inflamatório e possuem efeitos imunomodulatórios caracteristicamente relacionados à inibição do processo inflamatório (Jijon, Walker et al. 2005, Nemeth, Lutz et al. 2005). O ADP estimula a agregação plaquetária (Dombrowski, Ke et al. 1998).

Kukulski & Ben Yebdri (2009) demonstraram que, a indução quimiotática de neutrófilos por IL-8 requer uma ativação simultânea de receptores P2 via ligação do ATPe. O ATP é hidrolisado pela ação de poderosas nucleotidases de membrana plasmática (CD39 e CD73) para gerar ADP, AMP e, finalmente, a adenosina, que é sem dúvida importante produto de degradação ATP (Zimmermann 2000, Yegutkin 2014). A liberação de nucleotídeos no ambiente extracelular gera um gradiente de concentração suficiente para dar suporte a quimiotaxia de células, o recrutamento de células inflamatórias requer uma estreita cooperação entre estas duas purinas. Demonstrou-se que a liberação de ATP e sua hidrólise gerando de adenosina pode contribuir para a quimiotaxia induzida por quimiocinas (Junger 2011).

Deste modo, o ATP é um sinalizador de dano celular e os receptores P2 são bons sensores de perigo. Foi proposto que a adenosina, o mais importante produto de degradação ATP, poderá constituir um sinal importante de perigo, mas, dada a sua atividade essencialmente imunossupressora deste nucleosídeo, é provável que possa intervir em fases posteriores da resposta imune funcionando como um imunorregulador (Di Virgilio and Vuerich 2015).

2.5 ENZIMAS QUE CONTROLAM O METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES

A família das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5) são importantes enzimas responsáveis pelo metabolismo extracelular de nucleotídeos. Caracterizadas por hidrolisar ligações pirofosfato de nucleotídeos 5'-trifosfato ou nucleotídeos 5'-difosfato, na presença de cátions divalentes, geralmente Ca^{2+} ou Mg^{2+} , com variações na preferência pelos nucleotídeos e na razão de hidrólise dos nucleotídios tri e di-fosfatados (Laliberte and Beaudoin 1983).

Estas enzimas podem tanto ser secretadas quanto localizadas na porção externa de membranas celulares ou membranas de organelas (Ivanenkov, Murphy-Piedmonte et al. 2003, Leal, Strecher et al. 2005, Murphy-Piedmonte, Crawford et al. 2005). Todos os membros da família E-NTPDase possuem 5 regiões ou domínios muito bem conservados evolutivamente, denominados regiões conservadas de apyrases (ACR1 a ACR5) - presumivelmente sendo mais relevantes para sua atividade catalítica (Handa and Guidotti 1996, Zimmermann 2001, Robson SC 2006). Mutagênese sítio-dirigida em resíduos de aminoácidos conservados das regiões I e IV resulta na perda da atividade nucleotidásica dessas enzimas, como demonstrado por Smith and Kirley (1999).

Na literatura existem vários sinônimos para este grupo de enzimas como, ecto apyrase, ecto-NTPDase, CD 39. Em virtude dos vários nomes e para facilitar a comunicação no meio científico, Zimmermann e seus colaboradores (2001) propuseram uma nomenclatura única: E-NTPDases.

As E-NTPDases não hidrolisam nucleotídeos monofosfatados, de modo geral elas tem em comum uma ampla especificidade de substrato para nucleotídeos purínicos e pirimidínicos, diferindo na relação à preferência por determinado nucleotídeo 5'-trifosfato ou nucleotídeo 5'-difosfato. Apesar de comumente serem denominadas em função da utilização de nucleotídeos de adenina (ATPase, ADPase), por hidrolisarem ATP e ADP, nem sempre este é o substrato mais utilizado, havendo hidrólise também de outros nucleotídeos como UTP, UDP, GTP e GDP (Zimmermann 2000). Os nucleotídeos monofosfatados podem então servir como substrato para a ecto-5'-nucleotidase (CD73), que promove a liberação de nucleobases como a adenosina (Zimmermann 2001).

Estas enzimas podem ser separadas em dois grupos de acordo com a sua topografia de membrana (Zimmermann 2000). Os membros do primeiro grupo incluem os representantes em humanos: E-NTPDase1(CD39), E-NTPDase 2 (CD39L1), E-NTPDase 3 (CD39L2), E-NTPDase 4 (UDPase), todas apresentam dois domínios transmembranas, um localizado na porção N-terminal e o outro na extremidade C-terminal. O segundo grupo inclui a E-NTPDase 5 e uma possível E-NTPDase 6 que são ancoradas à membrana por apenas um domínio hidrofóbico localizado na extremidade N-terminal, seguido ou não por um sinal de clivagem, podendo resultar numa forma solúvel e/ou secretada.

Entretanto, os papéis fisiológicos das E-NTPDases não são totalmente conhecidos ainda. Algumas funções têm sido postuladas, incluindo participação na adesão celular, modulação de processos inflamatórios e da resposta imune (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002, Pizzirani, Ferrari et al. 2007), sinalização em terminações purinérgicas, além de estar envolvida na secreção e tráfego em vesículas, reciclagem de purinas, regulação da homeostase vascular. Tem sido proposta uma associação entre uma ecto-E-NTPDase e uma 5'-nucleotidase (que converte AMP em adenosina) na modulação destes processos biológicos, regulando a concentração dos nucleotídeos (sinalizadores) no ambiente extracelular (Enjyoji, Seigny et al. 1999, Lee and Marcus 2008, Yegutkin 2008).

O estudo das E-NTPDases tem avançado muito durante as últimas décadas mostrando a presença destas enzimas em vertebrados, invertebrados, plantas, leveduras (Handa and Guidotti 1996, Zimmermann and Braun 1996, Smith, Kirley et al. 1997) e diferentes protozoários como: *Toxoplasma gondii* (Bermudes, Peck et al. 1994, Silverman, Qi et al. 1998), *Leishmania amazonensis* (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001, Coimbra, Goncalves-da-Costa et al. 2002, Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006), *Entamoeba histolítica* (Barros, De Menezes et al. 2000), *Trichinella spiralis* (Gounaris 2002), *Trichomona vaginalis* (de Aguiar Matos, Borges et al. 2001), e *Crithidia deanei* (dos Passos Lemos, de Sa Pinheiro et al. 2002), *Trypanossoma cruzi* (Fietto, DeMarco et al. 2004, Mariotini-Moura, Bastos et al. 2013).

Acredita-se que ecto-E-NTPDases possuam papel importante em endoparasitas, desativando respostas do hospedeiro envolvidas com sinalização por nucleotídeos extracelulares, especialmente ATP e ADP (Maioli, Takane et al. 2004,

Sansom, Robson et al. 2008). Colaborando com esta hipótese, já está descrito na literatura que estas enzimas exercem um papel modulador sobre a inflamação e a resposta imune mediada por ATP e ADP extracelular em mamíferos (Mizumoto, Kumamoto et al. 2002). Diversos trabalhos mostram a importância das E-NTPDases na infecção causada por protozoários patogênicos, indicando uma correlação entre a atividade destas enzimas e a virulência (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, Santos, Possa et al. 2009).

Outra enzima que participa do metabolismo de nucleotídeos extracelulares em conjunto com as E-NTPDases é a enzima 5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5), que pertence a uma superfamília de dinuclear metalofosfoesterases, a qual hidrolisa diferentes substratos, incluindo fosfoproteínas, nucleotídeos e ácidos nucleicos (Hunsucker 2005, Strater 2006). Amplamente distribuída em bactérias, plantas e animais, a enzima catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster de vários nucleosídeos 5'-monofosfatados (ex.: AMP) a seus respectivos nucleosídeos como adenosina (Zimmermann and Braun 1996).

Embora essa enzima hidrólise uma variedade de nucleosídeos 5'-monofosfatados, foi demonstrado que a 5'-NT tem maior afinidade por AMP, com valores de Km na faixa de micromolaridade, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (Zimmermann and Braun 1996, Zimmermann 2001).

A enzima, além de participar da finalização das ações de nucleotídeos como ATP e ADP, é importante para reciclagem de nucleotídeos extracelulares, os quais são convertidos pela E-5'-NT e internalizados através de transportadores de nucleosídeos específicos. Como outras enzimas localizadas na superfície celular, a E-5'-NT, também conhecida como CD73, tem sido implicada em funções não-enzimáticas tais como ativação de células T, adesão célula-célula (Resta 1998, Zimmermann 2001, Strater 2006) e sinalizações transmembranas (Kawashima 2000).

2.6. RECEPTORES PURINÉRGICOS E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Os receptores purinérgicos são amplamente distribuídos por todos os tecidos corporais, sendo expressos sobre uma ampla variedade de células. (Bours,

Swennen et al. 2006). O papel do ATP e da adenosina extracelular, particularmente na imunidade e na inflamação, depende da expressão de receptores purinérgicos pelos tipos celulares que são essenciais à eficácia inflamatória e resposta imunológica (Bours, Swennen et al. 2006).

A maioria das células imunes co-expressam ambos os subtipos de receptores, tanto P1 quanto P2, sugerindo uma dual regulação da função celular através da sinalização purinérgica. O resultado dessa sinalização receptor-mediada é particularmente determinado pela magnitude da expressão de receptores, por exemplo, a quantidade desses receptores na membrana plasmática das células. Essa quantidade pode mudar durante o curso da inflamação e da resposta imune dependendo da natureza dessas respostas (Bours, Swennen et al. 2006, Di Virgilio and Vuerich 2015).

A família de receptores purinérgicos são compostas por receptores de adenosina do tipo P1 –subtipos (A1, A2A, A2B e A3) são receptores de adenosina, e receptores de ATP e ADP, do tipo P2 – Estes por sua vez são divididos em dois sub grupos os do tipo P2Y (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) acoplados a proteína G e do tipo P2X (P2X1-7) são do tipo canais iônicos dependentes de ligantes. (North 2000, Khakh 2006, Chen 2013, Burnstock 2014).

Os receptores de adenosina P1 são amplamente expressos em células imunes de linhagem mielóide e linfóide. O papel dos receptores A1 e A3 não é bem compreendido, entretanto receptores A2A e A2B exercem um papel fundamental no controle da inflamação. De acordo com a literatura os P1Rs são diferentemente acoplados a mobilização de Ca^{2+} intracelular e alterações nos níveis de cAMP, ativando várias vias intracelulares sejam elas estimulatórias ou inibidoras. Devido ao aumento de cAMP, a ativação dos receptores do tipo A2A e A2B desencadeiam ações imunossupressoras (Antonioli 2013).

Os P2YRs são bem caracterizados em células do sistema imune, expressos em neutrófilos e eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DC), linfócitos T e B, alguns subtipos P2YR também foram identificados em células assassinas naturais (NK)(Di Virgilio and Vuerich 2015).

A ativação de P2Y6R também foi investigada em DCs, eosinófilos, mastócitos, monócitos e neutrófilos, a sua ativação está associada com a liberação de citocinas

pró-inflamatórias. P2Y₁₂R está relacionado com a coagulação, uma vez que provoca agregação plaquetária, ativação e libertação de mediadores inflamatórios. (Dorsam 2004).

As investigações de P2XRs em células imunitárias começou juntamente com os estudos de P2YRs, mas se desenvolveu mais lentamente. Acreditava-se que canais iônicos teriam uma relevância menor na regulação da resposta imune e nos processos inflamatórios. Atualmente essa visão está mudando, diante de estudos que estão desvendando o papel dos receptores P2XRs na regulação das repostas imunes, principalmente em fagócitos mononucleares que expressam P2X₁R, P2X₄R e P2X₇R. Neutrófilos e eosinófilos humanos, especialmente após a ativação, linfócitos T e B e células NK expressam P2X₁R, P2X₄R e P2X₇R (Idzko 2014).

A ativação de receptores purinérgicos está intimamente relacionada ao desfecho da infecção por parasitos. A ativação de P2Y₂ e P2Y₄ por nucleotídeos de uracila UTP, mas não por UDP em macrófagos murinos frente a infecção por *L. amazonenses*, leva a um aumento a produção de NO e EROS via mobilização de Ca²⁺ intracelular, diminuindo a carga parasitária (Marques-da-Silva, Chaves et al. 2011).

Já a ativação de receptores do tipo P1 parece estar relacionada à susceptibilidade a LV. Um recente estudo mostra que camundongos *knockout* para receptores purinérgicos de adenosina tipo A_{2A} apresentam carga parasitária menor que camundongos selvagens quando infectados com *L. infantum*, demonstrando que a ativação de receptores de adenosina A_{2A} está relacionada com a modulação da resposta imunológica contra *L. infantum*, favorecendo o estabelecimento da infecção ao inibir a produção de IFN- γ e induzir a expressão de IL10 (de Lima 2015).

2.7 METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES E ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA EM PARASITAS

As purinas são de importância vital para os organismos vivos. Elas são essenciais para a síntese de ácidos nucléicos, proteínas e outros metabólitos bem como para reações que requerem energia. Considerando a elevada taxa metabólica e de replicação, os parasitos requerem uma ativa síntese de ácidos nucléicos, nos

quais necessitam de uma ampla demanda de nucleotídeos purínicos. Em geral, esses nucleotídeos podem ser sintetizados pela *via da biossíntese de novo* que utiliza componentes simples para a síntese de nucleotídeos purínicos, e/ou reciclados por uma via alternativa, a *via de salvação*, que é uma rota de reutilização, na qual a célula satisfaz suas necessidades purínicas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas. (el Kouni 2003).

Alguns trabalhos mostram de forma mais clara uma correlação entre a ativação de hidrólise de ATP e um dado efeito biológico na interação parasito-hospedeiro (Silverman, Qi et al. 1998, Sansom, Newton et al. 2007, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, Sansom, Robson et al. 2008, Santos, Possa et al. 2009).

Já foi demonstrado em *Leishmania tropica* e *Leishmania amazonensis* atividade E- NTPDásica dependente de Mg^{2+} (Meyer-Fernandes, Dutra et al. 1997, Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001), e em duas espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea (Herwaldt 1999). A localização desta enzima em *L. amazonensis* foi confirmada através de microscopia eletrônica utilizando anticorpos anti-CD39, sugerindo que essa proteína faça parte da família da E-NTPDase 1/CD39 (Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006). Foi observado um aumento na atividade enzimática no fim da replicação do parasito e em cepas mais virulentas. A atividade na forma amastigota, forma multiplicativa intracelular, foi dez vezes maior quando comparada com a forma promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001, Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006).

Estes estudos demonstram dados que associam à expressão gênica e/ou a atividade enzimática de ecto-nucleotidases de parasitos com a virulência, adesão celular, saída do parasito da célula infectada, controle da concentração de nucleotídeos das células hospedeiras e do meio extracelular e escape do sistema de defesa do hospedeiro (DeMarco, Kowaltowski et al. 2003, Maioli, Takane et al. 2004, Mariotini-Moura, Bastos et al. 2013, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar células nucleadas. Uma vez dentro da célula hospedeira, o parasita evita a fusão de vesículas lisossomais ao vacúolo parasitóforo evitando sua acidificação. Entretanto, a ligação de ATP a P2X7 leva a essa fusão e subsequente eliminação do parasito *in vitro*. Além disso, o ATP também induz produção de ROS e apoptose em macrófagos infectados (Correa G. 2010, Lees, Fuller et al. 2010). A produção de

EROs é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra parasitas em geral, e os baixos níveis de ROS levam a ativação do inflamassoma mediada pela ativação de caspase-1 e liberação de IL1- β (Spooner R. 2011).

Pesquisas mostraram atividade de hidrólise de nucleotídeos na superfície externa de outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono, ensaios utilizando parasitos intactos demonstraram que *T. brucei* exibiu atividade E-NTPDásica dependente de Mg^{2+} , hidrolisando ATP, CTP, GTP, UTP e ADP. Curiosamente, a atividade catalítica pode ser estimulada por outros cátions divalentes incluindo zinco. Os autores sugerem que esta enzima em *T. brucei* poderia desempenhar um papel no salvamento de purinas em meio extracelular (de Souza Leite, Thomaz et al. 2007).

Bisaggio e seus colaboradores em um trabalho publicado em (2003), sugerem o possível papel da atividade Ecto-ATPase dependente de Mg^{2+} na interação *T. cruzi*-célula hospedeira. A atividade NTPDásica está presente em todas as formas do parasito, embora haja uma variação na atividade de tripomastigotas que são as formas infectivas. As formas tripomastigotas exibiram atividade E-NTPDásica 20 vezes maior que a forma epimastigota forma não infectiva. Ainda nesse trabalho, foi demonstrando que parasitos crescidos na presença de suramina, o inibidor da E-NTPDases, apresentaram um aumento na atividade ATPásica e na capacidade infectiva, quando comparados com outros parasitos que cresceram na ausência de suramina que é inibidor de atividade Ecto-nucleotidásica.

Corroborando com esta ideia, Fietto e colaboradores (2004) demonstraram a presença de uma atividade de hidrólise de nucleotídeos tri e di fosfatados (E-NTPDase) na superfície externa do *T. cruzi* (cepa Y). A atividade NTPDásica está presente em todas as formas do parasito, sendo sugerida a possível participação das ecto-nucleotidases, bem como da E-NTPDase-1 de *T. cruzi* na via de captação de purinas, essencial para este parasito. Neste trabalho foi mostrado que o parasito possui atividade ecto-nucleotidásica em sua superfície, tendo sido isolado um gene denominado E-NTPDase-1 (E.C. 3.6.1.5) Neste mesmo trabalho, os autores relacionam o envolvimento de ecto-nucleotidases, incluindo a E-NTPDase-1, com o mecanismo de virulência relacionado à hidrólise de ATP extracelular (ATPe) e seus metabólitos, em função de que as formas tripomastigotas infectantes apresentaram

uma razão de hidrólise ATP/ADP maior que as formas epimastigotas não infectantes.

Em adição, Santos e seus colaboradores (2009) expressaram a E-NTPDase-1 de *T. cruzi* em sistema heterólogo bacteriano em sua forma solúvel (sem o peptídeo sinal amino-terminal de 36 aa), mostrando atividades similares de hidrólise sobre ATP e ADP. Estes mesmos autores realizaram ensaios analisando a infectividade em cultura de células e a virulência para camundongos quando esta enzima e/ou alguma homóloga foram inibidas por inibidores da atividade ou pela ação de soro policlonal anti-E-NTPDase-1, apresentando uma diminuição significativa da infectividade tanto *in vitro*, bem como da virulência *in vivo*.

Estudos realizados por de Souza, de Assis e seus colaboradores (2010) demonstra uma correlação entre a atividade hidrolítica sobre nucleotídeos de *L. amazonensis* na infecção e resposta imune em camundongos C57B/6. Estes dados corroboram com dados anteriores (Maioli, Takane et al. 2004, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008). Reforçando a hipótese de que as enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos são importantes fatores de virulência de *Leishmania* (Pinheiro, Martins-Duarte et al. 2006, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014) e *T. cruzi* (Santos, Possa et al. 2009)

Neste contexto, o presente trabalho propõe avaliar a influência da atividade E-NTPDásica e sua modulação, em uma cepa de *Leishmania infantum* em relação à adesão e infecção em macrófagos humanos. Nossa hipótese é de que o parasito ao controlar a concentração de nucleotídeos extracelulares através da atividade ectonucleotidásica possa se favorecer no processo de infecção, alterando a concentração de nucleotídeos extracelulares que ativam receptores purinérgicos, modulando o sistema imune do hospedeiro, resultando no estabelecimento da infecção.

3. JUSTIFICATIVA

O desfecho clínico da infecção por *Leishmania* pode variar desde uma infecção assintomática ou subclínica, na qual o indivíduo apresenta apenas intradermoreação positiva para antígeno de *Leishmania*, ou pode evoluir com doença sistêmica, a leishmaniose visceral clássica (LV), com espectro de gravidade ainda variável entre os pacientes (Badaró 1986). A interação parasito-hospedeiro é importante definidora desse desfecho clínico no hospedeiro humano e os eventos iniciais dessa infecção contam em parte com a interação com células fagocíticas e produtos da resposta imune inata, tais como as moléculas moduladoras liberadas por estas células.

Nesse contexto, a liberação de nucleotídeos no meio extracelular exerce influencia nesta interação, bem como as enzimas que participam na degradação desses nucleotídeos e seus receptores. As enzimas, denominadas E-NTPDases, também conhecidas como nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases são proteínas da família das ecto-nucleotidases, também chamadas de apyrases. O interesse nessas enzimas se baseia em vários dados obtidos na literatura relacionando a participação de ecto-nucleotidases, na interação parasito-hospedeiro, a exemplo da virulência, adesão, infectividade e aquisição de purinas em vários protozoários, com destaque para tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de chagas, e *Leishmania* sp, causador das leishmanioses (Fietto, DeMarco et al. 2004, Maioli, Takane et al. 2004, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

Alguns trabalhos mostram de forma clara uma correlação entre a hidrólise de ATP e um dado efeito biológico na interação parasito-hospedeiro, como por exemplo, a inibição dessa enzima em *T. cruzi* leva a uma redução de 50% desta infecção *in vitro* (Silverman, Qi et al. 1998, Sansom, Newton et al. 2007, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, Sansom, Robson et al. 2008, Santos, Possa et al. 2009).

Atividade dessas enzimas fora demonstrada em *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis* (Meyer-Fernandes, Dutra et al. 1997, Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001), e mais recentemente em *L. infantum* (Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014). Estes estudos associam a expressão gênica e/ou a atividade enzimática de ecto-nucleotidases desses parasitos com a virulência, adesão celular, saída do parasito da célula infectada, controle da concentração de

nucleotídeos das células hospedeiras e do meio extracelular. Estas enzimas também favorecem a diminuição da expressão de Interferon- γ e aumento da expressão de interleucina-10, modulando a resposta imune do hospedeiro, e favorecendo a sobrevivência do parasito. (DeMarco, Kowaltowski et al. 2003, Maioli, Takane et al. 2004, de Souza, de Assis et al. 2010, Gomes, de Carvalho et al. 2015). No entanto, não foi avaliado o efeito da expressão diferenciada dessas enzimas na infecção de macrófagos humanos por *Leishmania*.

Neste contexto, o presente trabalho propõe avaliar a influência da atividade E-NTPDásica na adesão e infecção de macrófagos humanos, por uma cepa de *Leishmania infantum*, isoladas de pacientes com LV. Nossa hipótese é que enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, principalmente na degradação do ATP extracelular e produção de adenosina, presentes na membrana de *L. infantum* estejam associadas à adesão e maior capacidade infectiva, favorecendo o parasito no processo de infecção, por modular a resposta imune do hospedeiro e resultar na disseminação sistêmica do parasito e progressão da doença.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influencia da atividade ecto-nucleotidásica e sua modulação nos momentos iniciais da infecção de *L. infantum* em macrófagos humanos.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a interferência de moduladores da atividade ecto-nucleotidásica em *L. infantum*.

Hipótese: A atividade ecto-nucleotidásica pode ser modulada de acordo com a oferta de purina.

- 2- Avaliar a atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* e seus efeitos na infecção de macrófagos.

Hipótese: Parasitos que apresentaram maior atividade ecto-nucleotidásica tem maior capacidade de infectar macrófagos humanos.

- 3- Avaliar a atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* e seus efeitos na adesão em células não fagocíticas.

Hipótese: Parasitos que apresentaram maior atividade ecto-nucleotidásica tem maior capacidade de aderir a células não fagocíticas.

- 4- Imunodetectar a expressão de E-NTPDases em *L. infantum*.

Hipótese: Os parasitos de L. infantum expressam em sua membrana enzimas E-NTPDases responsáveis pela hidrólise de ATP e ADP em AMP.

- 5- Comparar a atividade ecto-nucleotidásica de diferentes cepas de *L. infantum*.

Hipótese: Diferentes cepas apresentam diferentes padrões de hidrólise de nucleotídeos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. PARASITOS

As promastigotas de *L. Infantum* foram obtidas do Laboratório de Biologia Molecular (Hospital Universitário – Universidade Federal de Sergipe, HU-UFS). Essas amostras foram isoladas de pacientes com leishmaniose visceral, participantes do projeto de pesquisa sob a coordenação do Dr. Roque Pacheco de Almeida, e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-HU-UFS), código CAAE-0151.0.107.000-07.

Os parasitos foram retirados do ultrafreezer -80°C (Revco®) e descongelados a temperatura ambiente (25 °C), lavados em 10mL de solução salina e centrifugados a 1620 x g a 4 °C, e em seguida ressuspensos em 1 mL de meio Schneider completo, transferido inicialmente para um tubo contendo meio NNN.

As culturas foram mantidas em estufa B.O.D à temperatura de 24 ± 1°C. Semanalmente foi observado a motilidade e a morfologia dos parasitos e estes foram re-inoculados pela transferência de 1×10^5 promastigotas mL⁻¹ para uma nova garrafa de cultura contendo meio Schneider's Drosophila Medium Gibco® suplementado com 10% de SFB Soro Fetal Bovino. A curva do crescimento parasitária foi obtida, a partir da contagem diária de parasitas em câmara de Neubauer. Tal etapa teve como meta determinar as fases de crescimento estacionário, em que há maior proporção de promastigotas metacíclicas, forma infectante. Células de *L. infantum* em fase logarítmica foram estocadas a -80 °C, para manter as características fenotípicas do parasito.

5.2. MEIO DE CULTIVO DE *L. infantum*.

Schneider's Drosophila Medium Gibco® foi utilizado para o cultivo dos parasitas. Quando dito completo, consiste no meio Schneider® suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e antibiótico Estreptomicina 200 µg/mL (Sigma®). Este meio também compõe a fase líquida do meio bifásico McNeal, Novy e Nicolle (NNN) cuja fase sólida é composta por Agar - sangue modificado (Agar 1,5%, Peptona 0,7%, NaCl 0,6% e 10 % de sangue de coelho desfibrinado).

Os Macrófagos humanos advindos do PBMC (Células mononucleares de Sangue periférico) foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®) completo, suplementado com 10% de SFB e Ampicilina 100 µg/mL.

Para suplementação dos meios de cultura, o SFB foi previamente submetido a 56 °C durante 30 minutos com o objetivo de desnaturar as proteínas do sistema complemento, e impedir que estas interfiram no crescimento das culturas.

5.3. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES FAGOCÍTICAS.

Coletou-se 30 mL de sangue por punção venosa em tubos contendo 300µL heparina (1:1000). Em condições estéreis, o sangue heparinizado foi misturado com salina 0,9% na proporção de 1:2 e adicionado a tubos falcons 50mL contendo Ficoll hypaque GE (1 parte de Ficoll e 3 da mistura sangue-PBS). Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (400 x g/ 30 min a 28° C) o anel de PBMC foi coletado em tubos falcons de 15mL. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação (400 x g/ 10 min a 20° C) em meio RPMI 1640 (na proporção de 1 parte de células para 2 partes de meio). Ao fim das lavagens, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando do corante de vitalidade Azul de Trypan. Em seguidas as células foram semeadas em placa Lab Tek Termo Scientific® na concentração de 3×10^5 células mL⁻¹ por poço, incubadas por 3h a 37° C com 5% de CO₂ e em seguida lavadas com solução salina 0,9% para remoção das células não aderentes e cultivadas por cinco dias para diferenciação em macrófagos, em meio de cultura RPMI 1640 completo GIBCO 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina - Sigma®, 10% de Soro Fetal Bovino – SFB GIBCO) à 37° C com 5% de CO₂.

5.4. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS (ECTO-NUCLEOTIDÁSICA)

As atividades de hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP) foram medidas pela incubação de parasitos intactos, previamente lavados em salina 0,9%, incubados por 1 h a 37 °C em tampão de reação (NaCl 116,0 mM, KCl 5,4 mM, D-glicose 5,5 mM, MgCl₂ 5,0 mM e tampão hepes-tris 50,0 mM, pH 7,2), na presença de ATP, ADP ou AMP (SIGMA) 5,0 mM. Com o intuito de inibir a atividade Ecto-nucleotidásica os parasitos na fase estacionária foram incubados em tampão de reação com 250 µM de Suramina (Sigma®) por 1h a 26°C antes dos ensaios e posteriormente incubados como descrito acima e testado por (Santos, Possa et al. 2009). A reação foi interrompida pela adição, na proporção 1:1, de HCl 0,2 mM resfriado em gelo como descrito por (Fietto, DeMarco et al. 2004). Hidrólise não específica foi determinada pela adição de parasitos após o HCl 0,2 mM ser adicionado.

As suspensões foram centrifugadas e alíquotas dos sobrenadantes foram usadas para a quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado por meio do reagente colorimétrico (verde malaquita 0,2% e molibdato de amônio 10% 1:3, ambos ressuspendidos em HCl 4M). A curva padrão foi elaborada utilizando diferentes concentrações de soluções de Na₃PO₄, reagindo com a mesma mistura descrita acima. A quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado foi feita por espectrofotometria sob comprimento de onda de 650 nm (Taussky and Shorr 1953) e a atividade enzimática, indiretamente determinada pela quantidade de Pi liberado, calculada pela subtração da hidrólise não específica e ajustada para valores gerados por 1,0 x 10⁸ parasitos/h. foram realizados quatro experimentos independentes, cada um em triplicata.

5.5. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM *L. infantum*

Promastigotas de *L. infantum* cepa LVHSE49 no primeiro dia da fase estacionária de crescimento numa proporção de 10:1 (parasito/macrófago), sem estímulo, foram adicionados nos poços das placas Lab Tek® contendo macrófagos adivindos do PBMC descrito anteriormente. As culturas foram incubadas por 2 horas, após esse tempo foram os poços foram lavados com salina 0,9% para remoção dos

parasitos que não penetraram. As células foram incubadas por um período de 2 h e em seguida as placas foram fixadas e coradas com Kit Panótico Rápido LB®. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores independentes, de forma cega cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células.

5.6. DESENHO DO EXPERIMENTO COM INIBIDOR SURAMINA

Para a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* da Cepa LVHSE 49 foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 5.1. Em seguida os parasitos foram incubados por 1 h em meio *Schneider's Drosophila Medium* Gibco® completo, o qual fora adicionado 250µM de suramina que é inibidor da atividade ecto-nucleotidásica. Após esse tempo, os parasitos foram lavados duas vezes com 10 mL de salina 0,9%, livre de fosfato inorgânico. Posteriormente, 1×10^8 parasitos/mL foram utilizados para avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de acordo com o que está descrito no item 5.4.

A viabilidade celular foi assegurada antes e depois dos parasitos serem incubados por 1 h com o inibidor suramina, por meio da observação da motilidade e utilizando o corante de azul de trypan (Dutra P. M. L. 2001).

Para a avaliação da infectividade de *L. infantum* em macrófagos humanos em relação à inibição da atividade ecto-nucleotidásica com suramina, a infecção foi efetuada de acordo com o item 4.5. Os macrófagos humanos foram obtidos a partir de um PBMC de acordo com o item 4.3.

Os parasitos previamente incubados por 1 h com inibidor suramina 250µM, foram colocados em contato com macrófagos humanos por 2 h, em seguida as lâminas foram fixadas, coradas e avaliadas por microscopia óptica.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores independentes de forma cega, cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são

referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

Como controle os parasitos utilizados foram somente cultivados em meio Schneider's Drosophila Medium Gibco® completo, sem adição de suramina, e a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica e a capacidade infectiva foi efetuada como descrito acima.

5.7. DESENHO DO EXPERIMENTO DE PARASITOS CRESCIDOS EM MEIO DEPLETADO DE PURINA

Para a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* da Cepa LVHSE 49 foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 5.1. Em seguida os parasitos foram lavados duas vezes com 10 mL de salina 0,9%. Em seguida as células colhidas ressuspensas novamente em uma garrafa de cultura contendo 3mL meio MEM (*Modifield Eagle Medium*, L-prolina 300mg/L, HEPES 14.250 mg/L D-biotina 1 mg/L, ácido ascórbico 0,2 mg/L , Vitamina B12 mg/L , albumina bovina 15 mg/L , *phenol red* 10 mg/L , ácido lipólico 0,4 mg/L , Menadiona mg/L , Vitamina A mg/L, Hemina 10 mg/L e ácido fólico 11mg/L, pH 7,4) pobre em purina, com todos os componentes do meio, com exceção de purinas, por 48h, como descrito por (Gottlieb 1985, Campbell TA 1991, Carter, Yates et al. 2010) até a utilização para os ensaios, uma vez que esses parasitos adquirem purinas na forma de adenosina do meio, pela *via de salvação* de purinas.

A viabilidade celular foi assegurada antes e depois do crescimento em meio depletado de purina, por meio da observação da motilidade e utilizando o corante de azul de trypan (Dutra P. M. L. 2001).

A atividade ecto-nucleotidásica dos parasitos foi mensurada como já descrito no item 4.4, e o ensaio de infecção em macrófagos humanos foi efetuada de acordo com os itens 4.3 e 4.5.

Os parasitos crescidos por 48h em meio depletado de purina como já descrito no primeiro parágrafo, que por sua vez foram colocados em contato com macrófagos humanos por 2 h, em seguida as lâminas foram fixadas, coradas e avaliadas por microscopia óptica.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores independentes de forma cega, cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

Como controle os parasitos utilizados foram somente cultivados em meio Schneider's Drosophila Medium Gibco® suplementado com 10% de SFB Gibco® que contém purina, e a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica e a capacidade infectiva foi efetuada como descrito acima.

5.8. DESENHO DO EXPERIMENTO DE PARASITOS CRESCIDOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM ADENOSINA

Para a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* da Cepa LVHSE 49 foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 5.1. Os parasitos foram crescidos até à fase logarítmica estacionária em meio *Schneider's Drosophila Medium* Gibco® completo, suplementado com 200µM de adenosina Sigma®, produto da hidrólise do ATP, fonte de purina para o parasito.

A viabilidade celular foi assegurada antes e depois dos parasitos serem crescidos em meio suplementado com adenosina, por meio da observação da motilidade e utilizando o corante de azul de trypan (Dutra P. M. L. 2001).

Em seguida a atividade ecto-nucleotidásica desses parasitos foi avaliada de acordo com o item 4.4, e o ensaio de infecção em macrófagos humanos foi efetuado de acordo com os itens 4.3 e 4.5.

Os parasitos crescidos em meio suplementado com 200µM de adenosina, como já descrito no primeiro parágrafo, foram colocados em contato com macrófagos humanos por 2 h, em seguida as lâminas foram fixadas, coradas e avaliadas por microscopia óptica.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores cegos e independentes, cada um deles contando

três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

5.9. DESENHO DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ATP NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Para a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* da Cepa LVHSE 49 foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 5.1. Em seguida os parasitos foram incubados por 1 h em meio *Schneider's Drosophila Medium* Gibco® completo. Após esse tempo, os parasitos foram lavados duas vezes com 10 mL de salina 0,9%, livre de fosfato inorgânico. Após essa ação, 1×10^8 células/mL parasitos foram utilizados para avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de acordo com o que está descrito no item 5.4.

Para avaliar a influência do ATP na infecção de macrófagos humanos por *L. infantum*, os parasitos foram cultivados até a fase estacionária como descrito no item 4.1, e colocados em contato com macrófagos humano (obtido através de um PBMC descrito no item 5.3.) na proporção 10:1 (parasito/macrófago), durante 2 h na presença de 100µM de ATP. Em seguida as lâminas foram fixadas, coradas e avaliadas por microscopia óptica.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores independentes de forma cega, cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

5.10. DESENHO DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ANTICORPO ANTI E-NTPDase-1 NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS

Para a avaliação da atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* da Cepa LVHSE 49 foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 5.1. Em seguida os parasitos foram incubados por 1 h com anti E-NTPDase-1 de humano (Sigma®) 1:100. Após esse tempo foi avaliada a atividade ecto-nucleotidásica de acordo com o que está descrito no item 5.4.

Para avaliar a influência do anticorpo anti E-NTPDase-1 de humano (Sigma®) na infecção de macrófagos humanos por *L. infantum*, os parasitos foram cultivados até a fase estacionária como descrito no item 4.1, e colocados em contato com macrófagos humano (obtido através de um PBMC descrito no item 5.3.) na proporção 10:1 (parasito/macrófago), durante 2 h na presença do anticorpo (1:100). Em seguida as lâminas foram fixadas, coradas e avaliadas por microscopia óptica.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico Nikon L200, o número de amastigotas por 100 macrófagos e a percentagem de macrófagos infectados foram avaliados por dois observadores independentes e de forma cega, cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

A viabilidade celular foi assegurada antes e depois dos parasitos serem incubados com anticorpo anti E-NTPDase-1 de humano (Sigma®), por meio da observação da motilidade e utilizando o corante de azul de trypan (Dutra P. M. L. 2001).

5.11. IMUNODETECÇÃO DE E-NTPDASE-1 E E-NTPDASE-2 EM EXTRATO BRUTO DE *L. infantum*

Os membros da família das E-E-NTPDases possuem 5 regiões denominados regiões conservadas de apyrases (ACRs) – estas regiões ou domínios 1,2,3,4 são associadas a atividade catalítica dessas enzimas. As E-NTPDases possuem uma alta homologia entre as espécies, sendo esses domínios evolutivamente conservados (Handa and Guidotti 1996). Devido a essa grande homologia, foram utilizados para as análises deste trabalho o anticorpo comercial anti-E-NTPDase-1 de humano produzido em coelho Sigma®, e o anti E-NTPDase-2 de humano produzido em coelho Sigma®. Uma vez que o anticorpo anti E-NTPDase-1 é capaz de reconhecer uma E-NTPDase de aproximadamente 70 KDa em *T. cruzi* (Cunha 2010).

A imunodeteção de E-NTPDase-1 e E-NTPDase-2 foi realizada por meio da técnica de *Western blotting*, de acordo com (Sambrook and Russel 2001). O extrato

bruto de *L. infantum* na fase estacionária foi preparado a partir de 1×10^8 células/mL lisadas na presença de coquetel de inibidor de protease Sigma® contendo (AEBSF at 2 mM, Aprotinina 0.3 μ M, Bestatina 116 μ M, E-64 14 μ M, Leupeptina at 1 μ M e EDTA 1 mM).

Em seguida as amostras foram aplicadas em 4 canaletas do gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 10%, a eletroforese foi realizada com tampão de corrida 1X (Tris 25 mM, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) em condições constantes de voltagem (80V), utilizando-se o sistema *Mini Protean III Dual Slab Cell Bio-Rad®*. Após a separação proteica deu-se início a transferência para membrana de nitrocelulose (por 2 horas, 70 V, 250 mA) utilizou-se o sistema de transferência molhada *Mini transblot electrophoretic transfer cell Bio-Rad®* em condições de acordo com manual do fabricante.

Após a transferência as membranas foram coradas em solução de ponceau S, para verificação da qualidade da transferência. Em seguida, as membranas foram bloqueadas em PBS-Tween (PBS-T) 0,1% acrescido de Albumina 3% por 12 horas a 4° C. Decorrido esse tempo foram efetuadas 3 lavagens de 5 min com PBS-T 0,1% e incubadas por 12 horas com cada anticorpo primário separadamente em PBS-T 0,1% os seguintes anticorpos foram utilizados na diluição de 1:250, anti-E-NTPDase-1 de humano produzido em coelho Sigma®, antiE-NTPDase-2 de humano produzido em coelho Sigma® e Anti IgG de coelho Sigma® como controle negativo. Posteriormente foram feitas 3 lavagens com PBS-T 0,1%, seguida da incubação por 2 horas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 488 Santa Cruz Biotechnology (1:5000). Novamente foram efetuadas 3 lavagens com PBS-T 0,1% e finalmente analisados em sistema ChemiDoc MP BIORAD®.

5.12. DETECÇÃO E-NTPDase EM *L. infantum* POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Promastigotas na fase estacionária foram aliquoteados da cultura e colocadas em tubos eppendorf® passando por três lavagens sendo recuperados por centrifugação a 786 g por 5 min a 4° C, em seguida os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e 1×10^6 células foram fixados com glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 2% e cacodilato 0,1%. Posteriormente os parasitos foram

espalhados em lâminas histológicas antecipadamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma®) para facilitar a aderência dos parasitos na lâmina. Após 30 min, as lâminas foram bloqueadas com glicina 50µM por 30 min seguido de um bloqueio com PBS-T 0,01% BSA 1% por 1 h, após o bloqueio foi efetuado a incubação com anticorpo primário IgG de coelho anti E-NTPDase 1 e 2 de humano produzido em coelho Sigma® e como controle negativo Isotipo IgG de coelho Sigma® todos na diluição de 1:20 em câmara úmida por 12 horas, na sequência as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS-T 0,01% BSA 1% e incubadas com anticorpo secundário anti IgG de coelho ligado a Alexa 488 Santa Cruz Biotechnology® 1:500, por 2 horas, após esse período as lâminas foram montadas e analisadas em Microscópio confocal LEICA® TCS SP8.

5.13. DESENHO DO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS

Para avaliar a influência da atividade ecto-nucleotidásica na adesão de *L. infantum* em células não fagocíticas, os parasitos foram cultivados em meio com inibidor suramina 500 µM e comparados com o controle no qual os parasitos foram cultivados somente em meio de cultura, a atividade ecto-nucleotidásica foi avaliada, e em seguida os parasitos foram colocados em contato com as células não fagocíticas fibroblastos L929 e a adesão foi avaliada como descrito abaixo no item 4.11.2.

Foi utilizado neste ensaio, fibroblastos L929 por serem células não fagocíticas, sendo possível discriminar adesão de internalização e fagocitose, o que não seria possível com macrófagos que são células fagocíticas. Ademais *L. infantum* é capaz de infectar fibroblastos como descrito por (Minero, Chinchilla et al. 2004).

5.13.1. CURVA DE CRESCIMENTO DE *L. infantum* NA PRESENÇA DE SURAMINA

Antes de efetuar os experimentos de adesão foi avaliada a influência da suramina no crescimento de *L. infantum*. Para isso os parasitos foram crescidos por 7 dias na ausência e na presença de 500µM de suramina. Assim $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ células foram inoculadas em 2 garrafas uma contendo inibidor e outra somente meio de cultura e o crescimento foi estimando por contagem diária dos parasitos em câmara

de Neubauer, por dois observadores diferentes, considerando 4 experimentos independentes.

5.13.2. ADESÃO DE *L. infantum* EM CÉLULA NÃO FAGOCÍTICA

Promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas até a fase estacionária sob duas condições: o controle foi cultivado em uma garrafa de cultura contendo 3mL de meio Schneider's completo, e uma segunda garrafa de cultura contendo 3mL de meio Schneider's completo suplementado com 500 µM de Suramina (Sigma®).

Fibroblastos L929 foram previamente plaqueados em placa Lab Teck na concentração de 1×10^5 células por poço. Parasitos e fibroblastos foram deixados em contato na proporção de 5:1 em meio RPMI a 37°C por 1h, de acordo com (Bisaggio, Peres-Sampaio et al. 2003), após o tempo de incubação as placas foram lavadas com salina 0,9% para remoção dos parasitos não aderidos, na sequência lâminas foram coradas com Kit Panótico Rápido LB®.

A análise das lâminas foi baseada na contagem do número de parasitos aderidos por 100 fibroblastos e a percentagem de fibroblastos com parasitos aderidos em microscópio óptico Nikon L200. As lâminas foram avaliadas por dois observadores independentes de forma cega, cada um deles contando três diferentes campos da lâmina, contendo 100 células. Os resultados são referentes às médias de 4 experimentos independentes cada um em triplicata, com resultados similares.

5.14. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA ENTRE DIFERENTES CEPAS DE *L. infantum*

A atividade ecto-nucleotidásica de diferentes cepas de *L. infantum* do criobanco do laboratório de Biologia Molecular da UFS foi mensurada de acordo com o item 4.4. Assim os parasitos foram cultivados até a fase estacionária de acordo com o item 4.1. Foram efetuados 3 experimentos independentes em triplicata.

5.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com resultados similares obtidos em três ou quatro experimentos independentes. As análises foram feitas pelo programa GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA). O teste de normalidade analisado pelos testes D'Agostino & Pearson. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Mann Whitney. Os valores de P iguais ou menores que 0.05 foram considerados significativos. Os dados foram expressos como médias \pm os desvios padrões.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA DE *L. infantum* CULTIVADAS EM MEIO DEPLETADO DE PURINA E NA PRESENÇA DE INIBIDOR DE E-NTPDASE.

A atividade ecto-nucleotidásica dos parasitos foi determinada a partir da dosagem de fosfato inorgânico (Pi), na presença de inibidor suramina (Figura 1A) Os parasitos incubados por 1 h com inibidor de apyrase, suramina, apresentaram uma redução de cerca de 70% na hidrólise de ATP $p < 0,05$, de 48% na hidrólise de ADP, e de 53% na hidrólise de AMP $p < 0,05$ quando comparados com os parasitos que não tiveram contato com o inibidor (figura 1 A).

Para avaliar se a ausência de purina no meio de cultivo poderia modular a atividade ecto-nucleotidásica, os parasitos foram cultivados por 48 h em meio depletado de purina (figura 1 A), a capacidade hidrolítica aumentou de cerca de 65% para ATP $p < 0,05$ e de 63% para AMP $p < 0,05$. A hidrólise do ADP não apresentou aumento significativo quando comparado com o controle (Figura 1 A).

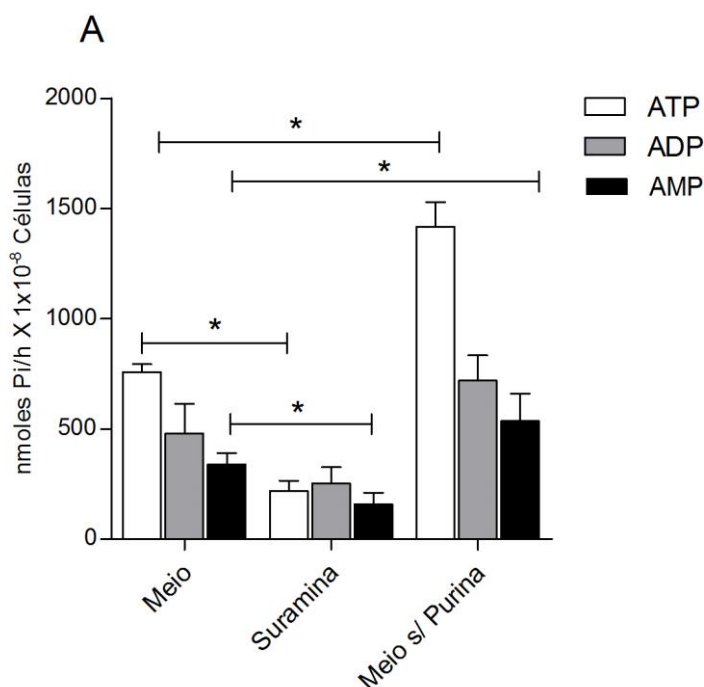


Figura 1. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica de *L. infantum*. (A) Gráfico comparando as dosagens de fosfato inorgânico em Promastigotas de *L. infantum* LVHSE 49 cultivados em três condições diferentes: meio de cultura, com o inibidor suramina, e

em meio depletado de purina. As barras representam a média \pm SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

Para avaliar se a capacidade de hidrólise de nucleotídeos está relacionada com a maior capacidade infectiva de *L. infantum*. Macrófagos humanos foram infectados com parasitos controles ou pré-tratados com suramina, ou ainda cultivados em meio depletado de purina. A taxa de infecção de macrófagos infectados com parasitos previamente incubados com suramina foi de $28,16 \pm 3,75$ quando comparamos com macrófagos infectados com parasitos controle não tratados $61,45 \pm 5,1$, $p < 0,05$ (figura 2A). Em relação ao número de amastigotas para cada 100 macrófagos, com parasitos tratados com suramina apresentaram um total de amastigotas foi $70,02 \pm 4,2$, e os controles $118,5 \pm 5,03$ $p < 0,05$ (figura 2B). A taxa de infecção para os parasitos tratados com inibidor de E-NTPDases foi de cerca de 50% menor em relação ao controle, além de apresentarem um menor número de parasitos intracelulares $p < 0,05$ (figura 2A e 2B).

Uma vez aumentada a atividade ecto-nucleotidásica nos parasitos cultivados em meio depletado de purina, foram realizadas investigações sobre a capacidade infectiva desses parasitos em macrófagos. O número de macrófagos infectados foi de $82,75 \pm 5,2$ $p < 0,05$, em comparação ao controle, que apresentou uma taxa de $63,16 \pm 6,6$ (figura 2A). A taxa de infecção para os parasitos que passaram por privação de purinas foi, portanto, significativamente maior (cerca de 25%). O número de amastigotas por 100 macrófagos também foi maior na condição de meio depletado de purina $p < 0,05$ (figura 2 B).

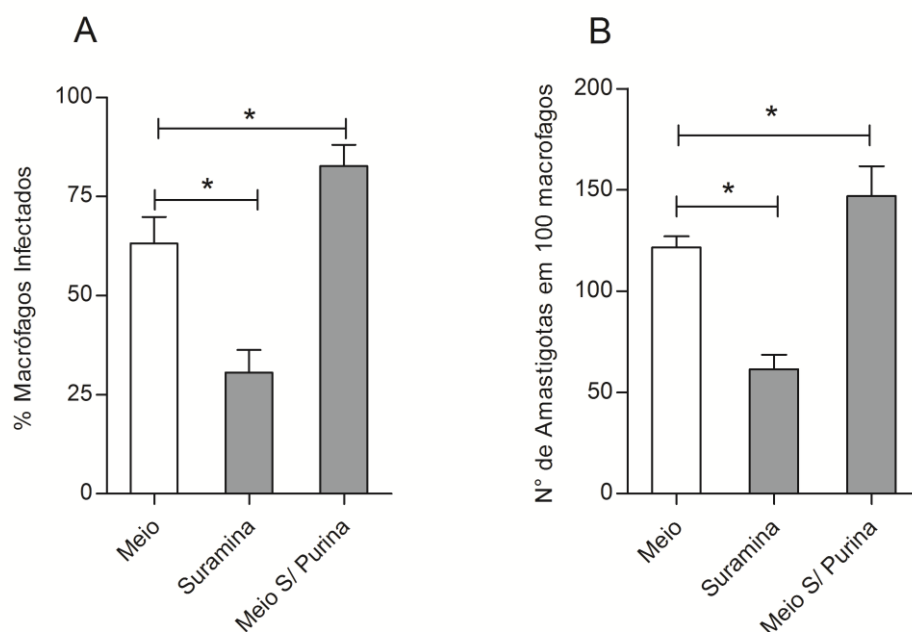


Figura 2. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica altera a capacidade infectiva de *L. infantum* em macrófagos humanos. (A) Porcentagem de macrófagos infectados. (B) Número de amastigotas em cada 100 macrófagos. Meio- MΦ infectados com parasitos cultivados em meio de cultura Schneider's completo. Suramina MΦ infectados com parasitos incubados por 1 h com suramina. Meio s/ Purina - MΦ infectados com parasitos cultivados por 48h em meio depletado de purina. As barras representam a média ± SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

6.2. INFLUÊNCIA DA ADENOSINA NA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR *L. infantum*.

A adenosina é o produto da reação de hidrólise do ATP, portanto, a oferta deste produto, que é utilizado como fonte de purina por esses parasitos, o que diminui a necessidade desta reação. Para se testar se a oferta de adenosina alteraria a capacidade de hidrólise de nucleotídeos em *L. Infantum* e, conseqüentemente, a capacidade de infecção dos mesmos, os parasitos foram cultivados em meio suplementado com adenosina, em seguida, a atividade ecto-nucleotidásica foi avaliada. Os parasitos cultivados na presença de adenosina apresentaram uma capacidade de hidrólise de ATP, ADP e AMP significativamente menor, comparado ao controle, sendo de 30% para o ATP; quase 50% para o ADP; e 5 vezes para o AMP $p < 0,05$ (figura 3A).

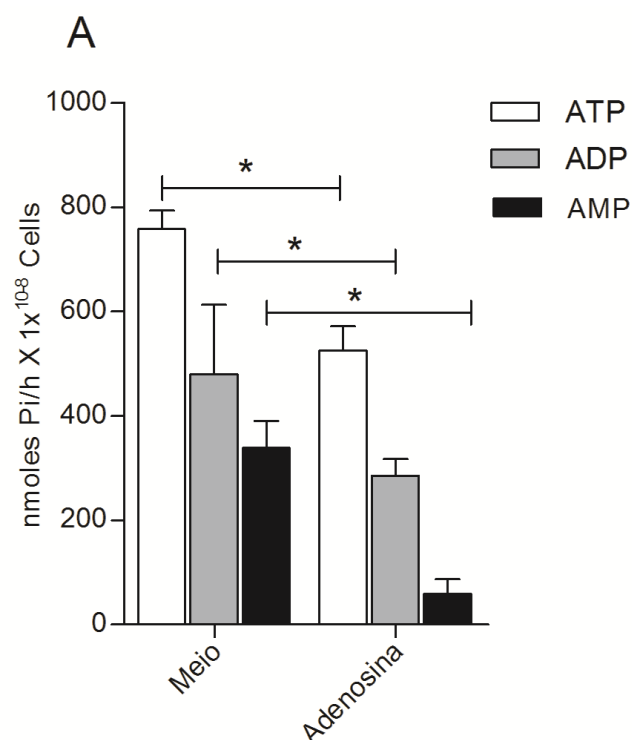


Figura 3. Influência da Adenosina na Atividade Ecto-Nucleotidásica (A) Atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* cultivadas em duas condições diferentes: meio de cultura e meio suplementado com adenosina. As barras representam a média \pm SD de quarto experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

Para verificar se a modulação da atividade ecto-nucleotidásica desses parasitos poderia interferir na habilidade de infectar macrófagos, os parasitos foram cultivados em meio rico em adenosina, apresentando uma taxa de infecção de $43,51 \pm 4,3$, contra $61,45 \pm 3,7$, do controle (figura 4A). A capacidade infectiva de *L. infantum* cultivado em oferta de adenosina foi 30% menor em relação ao controle $p < 0,05$ (figura 4A).

O número de amastigotas em cada 100 macrófagos foi significativamente menor nos parasitos expostos à adenosina $75,83 \pm 10,3$ comparado com o controle que apresentou $123,16 \pm 13,9$ $p < 0,05$ (figura 4B).

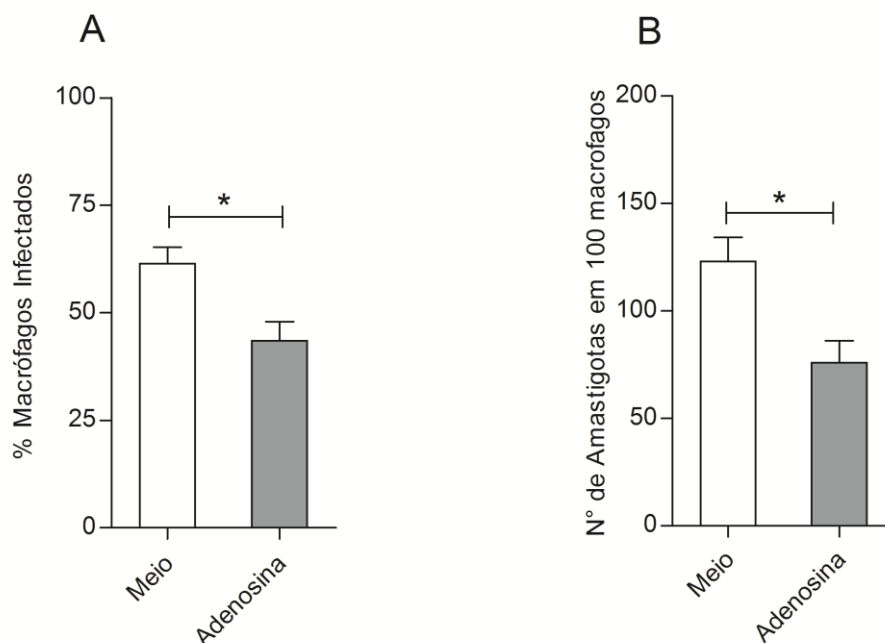


Figura 4. Modulação da Atividade Ecto-Nucleotidásica pela adenosina e seus efeitos na infecção de macrófagos humanos por *L. infantum*. (A) Porcentagem de macrófagos infectados com parasitos cultivados em duas condições diferentes: meio de cultura e meio suplementado com adenosina. (B) Número de amastigotas em cada 100 macrófagos. Meio- MΦ infectados com parasitos cultivados em Schneider's completo. Adenosina- MΦ infectados com parasitos cultivados em meio suplementado com adenosina. As barras representam a média \pm SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

6.3. EFEITO DO ATP NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR *L. infantum*.

Para avaliar o efeito da presença de ATP no momento da infecção de macrófagos com *L. infantum*, esta molécula foi adicionada ao meio de cultivo durante o período de interação entre os parasitos e as células humanas. A taxa de infecção foi determinada pela contagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas internalizados. O número de macrófagos infectados na presença de ATP foi de $83,72 \pm 5,8$, maior (cerca de 25%) comparado ao controle que apresentou uma taxa de $60,71 \pm 8,18$ $p < 0,05$ (figura 5A). Assim como ocorreu um aumento no número de amastigotas em cada 100 macrófagos, de $146,81 \pm 19,22$ na presença de ATP contra $102,16 \pm 10,63$ na ausência de ATP, $p < 0,05$ (figura 5B).

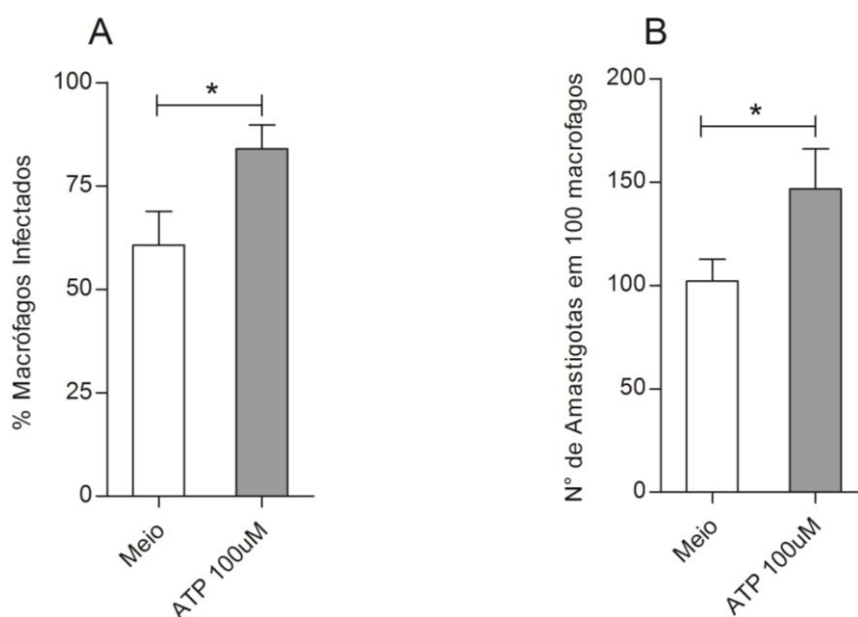


Figura 5. Efeito do ATP na infecção de macrófagos humanos por *L. infantum*. (A) Gráfico mostrando a porcentagem de MΦ infectados. (B) Número de amastigotas em cada 100 MΦ. As barras representam a média \pm SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

6.4. PARTICIPAÇÃO DO ANTICORPO ANTI E-NTPDASE-1 HUMANO NA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS POR *L. infantum*.

Com intuito de avaliar a participação da enzima E-NTPDases na infecção de *L. infantum* em macrófagos, os parasitos foram incubados com anticorpo anti-E-NTPDase-1 de humano produzido em coelho, e a capacidade de hidrólise de nucleotídeos de adenina, ATP, ADP e AMP foi mensurada. A concentração de fosfato inorgânico não se alterou na presença do anticorpo em relação aos controles. Portanto, o anticorpo não foi capaz de inibir a capacidade de hidrólise de nucleotídeos nos parasitos (figura 6 A).

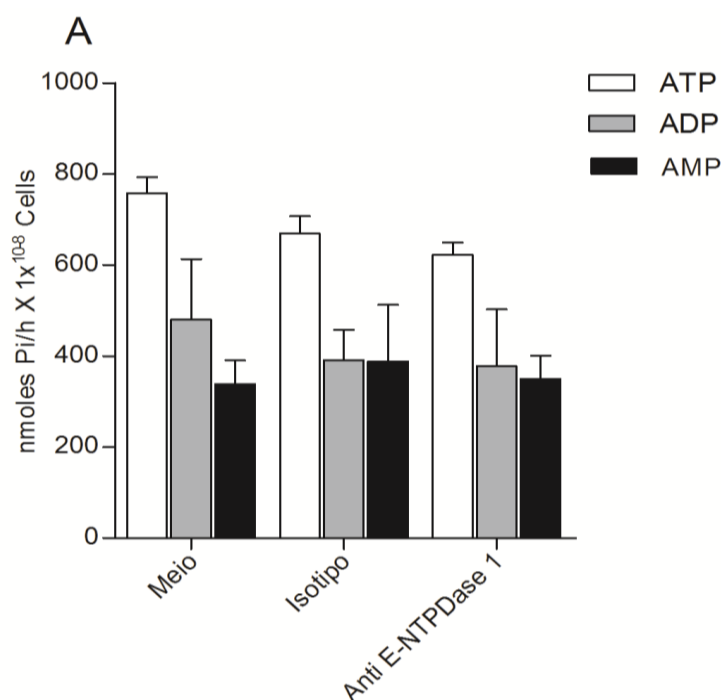


Figura 6. Atividade Ecto-nucleotidásica de *L. infantum* na presença de anticorpo anti E-NTPDase-1. (A) Meio- hidrólise de ATP, ADP, e AMP de parasitos cultivados em meio Schneider's completo. Isotipo – controle negativo Isotipo (1:100) IgG de coelho. Anti E-NTPDase-1- parasitos foram incubados por 1h a 37°C com anticorpo anti E-NTPDase 1 de humano produzido em coelho (1:100), com a atividade enzimática foi avaliada pela dosagem de fosfato inorgânico. Os resultados representam a média \pm SD de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

Para avaliar o papel das E-NTPDases presentes na superfície de *L. infantum* sobre a infectividade em macrófagos humanos, os parasitos foram incubados previamente com anti-E-NTPDase 1 de humano produzido em coelho Sigma® (1:100), e em seguida colocados em contato com os macrófagos humanos, podemos observar que os parasitos que estiveram na presença dos anticorpos tiveram uma taxa infectiva de $39,91 \pm 6,0$ contra $61,45 \pm 3,74$ controle, a infectividade foi aproximadamente 35% menor em relação aos parasitos que não estiveram $p < 0,05$ (figura 7A), além disso foi observado também uma redução no número de parasitos intracelulares na presença do anticorpo, quando comparados com os controles, foi evidenciado $78,20 \pm 3,1$ amastigotas em 100 macrófagos, já os controles apresentaram $120,79 \pm 5,03$ amastigotas, $p < 0,05$ (Figura 7B).

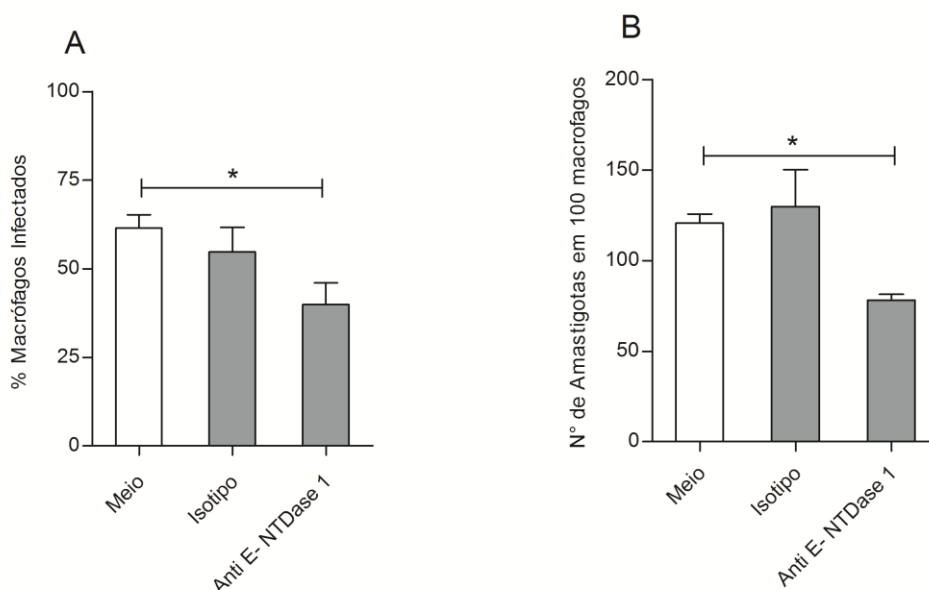


Figura 7. Influencia do anticorpo anti E-NTPDase-1 na infecção de macrófagos Humanos por *L. infantum*. (A) Porcentagem de MΦ infectados. (B) Número de amastigotas em 100 MΦ. Meio- MΦ infectados com parasitos cultivados em meio Schneider's completo Isotipo- MΦ infectados com Parasitos incubadas com Isotipo (1:100) IgG de coelho. Anti E-NTPDase-1- MΦ infectados com parasitos incubados 1h a 37°C com anticorpo anti E-NTPDase 1 de humano produzido em coelho (1:100) As barras representam a média ± SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05.

6.5. IMUNODETECÇÃO DAS ISOFORMAS E-NTPDASE-1 E E-NTPDASE-2 EM *L. infantum*

O ensaio de imunodeteccção em extrato bruto de *L. infantum*, identificou uma isoforma de aproximadamente 70KDa referente a E-NTPDase-1 utilizando o anticorpo anti E-NTPDase-1 de humano Sigma®. Entretanto este anticorpo não foi capaz de reconhecer a isoforma E-NTPDase-2 de aproximadamente 40KDa (figura 8 A). Identificamos uma segunda banda acima da banda de 70KDa devido a autofluorescência, provavelmente relacionada a alguma proteína expressa por promastigotas na fase estacionária, que coincidentemente emite fluorescência no mesmo comprimento de onda do fluoróforo Alexa 488 conjugado ao anticorpo secundário utilizado para as análises (excitação de 493nm e emissão 525-530 nm). A figura 8D mostra a membrana após a transferência seguida de bloqueio sem incubação prévia com nenhum anticorpo, evidenciando autofluorescência.

O anticorpo anti E-NTPDase-2 de humano reconhece as duas isoformas putativas para *L. infantum*, uma E-NTPDase de aproximadamente 70 KDa e uma segunda isoforma de 40KDa (figura 8B).

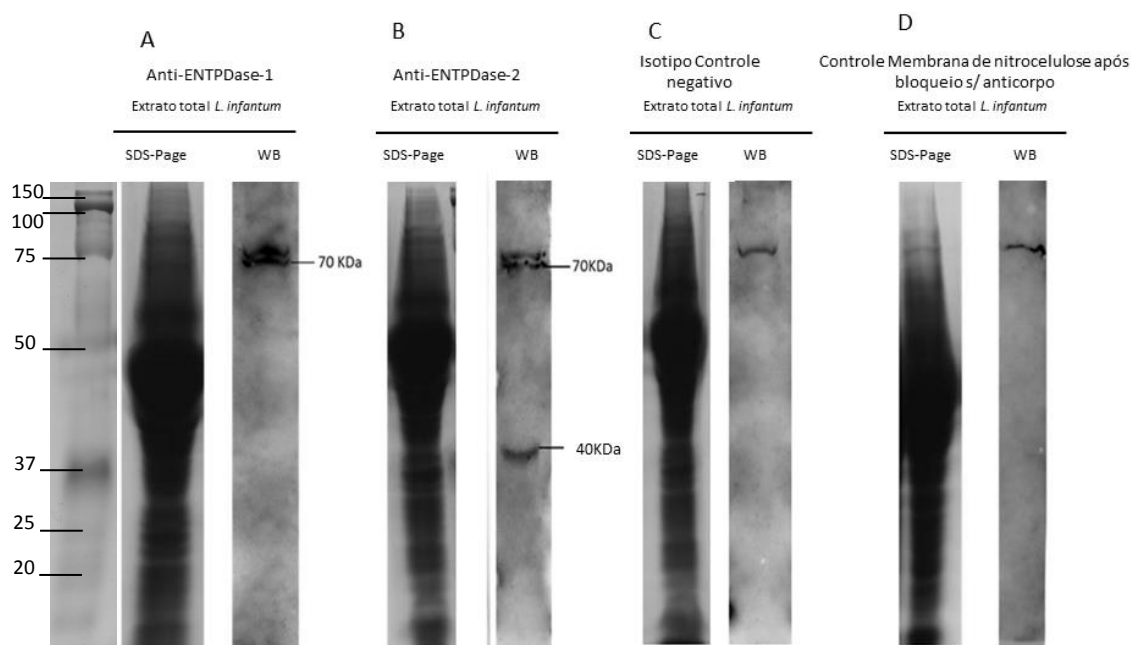


Figura 8. Imunodeteção de E-NTPDase 1 e 2 em extrato bruto de *L. infantum*. SDS-page gel de poliacrilamida 10%. Western blotting (WB), membrana de nitrocelulose foram incubadas com Anti NTPDase 1 e 2 de humano produzido em coelho e marcado com anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com Alexa 488, gel de SDS-page foi corado com azul de comassie. (A) Expressão de E-NTPDase 1 aproximadamente 70KDa. (B) Expressão de E-NTPDase 2 de aproximadamente 40 KDa. (C) Controle negativo a membrana de nitrocelulose foi incubada com Isotipo IgG de Coelho (1:250). (D) Autofluorescência, membrana de nitrocelulose após o Bloqueio com PBS–T 3% BSA.

6.6. MICROSCOPIA CONFOCAL DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE E-NTPDASES 1 E 2 NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE PROMASTIGOTAS DE *L. infantum*.

Identificamos a presença de E-NTPDases na superfície externa de promastigotas de *L. infantum*. As figuras 9A e figura 9B evidenciam a imunomarcagem de E-NTPDase-1 de *L. infantum* com o anticorpo anti E-NTPDase-1 de humano. Não é possível distinguir entre as duas isoformas utilizando o anticorpo anti E-NTPDase-2 (Figura 9 C-D), pois este anticorpo reconhece tanto a isoforma E-NTPDase-1 de 70KDa e como a isoforma E-NTPDase 2 de 40 KDa. Nota-se que há

uma distribuição homogênea dessas enzimas ao longo do corpo celular desses parasitos (figura 9 A – D). As imagens foram feitas a partir células intactas, e nenhuma marcação foi observada no controle (figura 9 E-F).

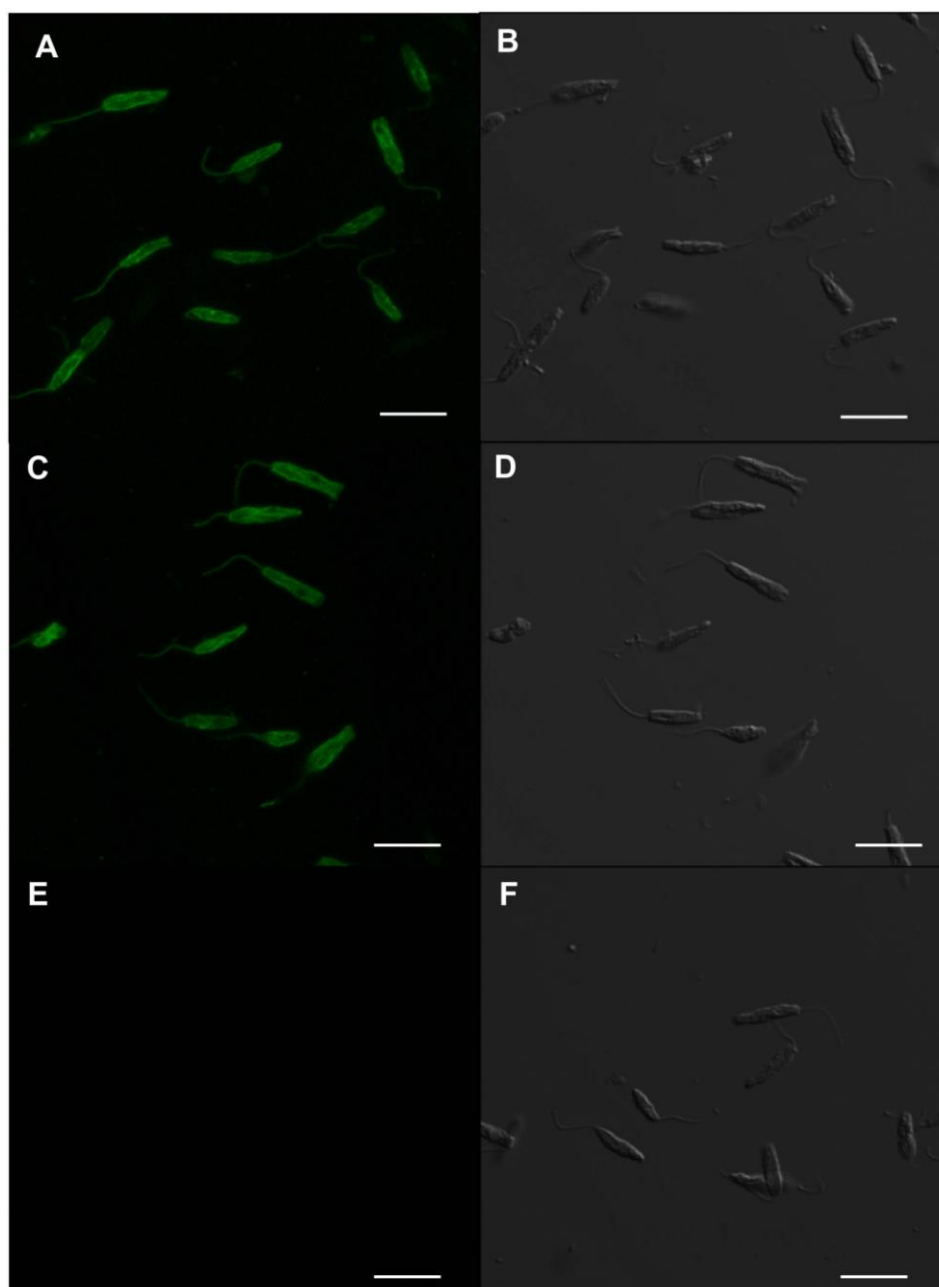


Figura 9. Microscopia confocal demonstrando a presença de E-NTPDases 1 e E-NTPDases 2 na membrana de promastigotas de *L. infantum*. Parasitos não permeabilizados foram fixados e marcados com anticorpo primário IgG de coelho anti E-NTPDase 1 e anti E-NTPDase 2 e visualizados com a marcação do anticorpo secundário anti IgG de coelho ligado a Alexa 488. (A) Promastigotas marcados com anticorpo anti E-NTPDase 1. (B) Contraste de fase. (C) Promastigotas marcados com E-NTPDase 2. (D) Contraste de fase. (E) Controle negativo, promastigotas incubados com Isotipo IgG de coelho e anticorpo secundário anti IgG de coelho ligado a Alexa 488. (F) Contraste de fase. Barras representam 10μm.

6.7. PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE ECTO-NUCLEOTIDÁSICA NA ADESÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS NÃO FAGOCÍTICAS.

Não houve diferença no crescimento de *L. infantum* na presença e ausência de suramina. A integridade celular e a viabilidade dos promastigotas foram asseguradas durante todo o cultivo através da análise da motilidade celular, as células mortas foram discriminadas utilizando o corante azul de tripan (figura 10).

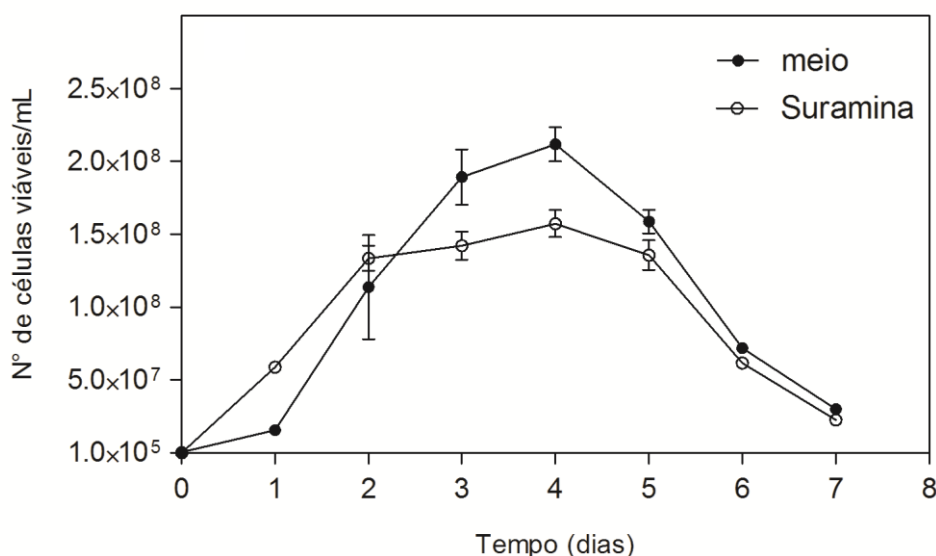


Figura 10. Efeito da suramina no crescimento de *L. infantum*. Curva de crescimento de *L. infantum* LVHSE 49 cultivadas em meio Schneider's completo (círculo preto) e na presença de 500µM de suramina (círculo branco). Os valores médios do número de células contadas em câmara de Neubauer são apresentados em triplicata a partir de quatro experimentos independentes.

Houve uma modulação da atividade ecto-nucleotidásica (figura 11 A) dos parasitos cultivados por 72 h na presença de suramina que apresentaram uma maior atividade ecto-nucleotidásica. Esta aumento na atividade ecto-nucleotidásica após o cultivo de *L. infantum* com suramina por 72h pode ser devido ao aumento na expressão da E-NTPDases e 5' nucleotidases em função da inibição constante feito pela presença do inibidor durante o cultivo, uma vez que esses parasitos são incapazes de efetuar a síntese *de novo* de purinas e necessitam captar purinas do meio através da via de salvação, o cultivo com suramina aumenta a capacidade de hidrólise de nucleotídeos em epimastigotas de *T. cruzi*, essa alteração também foi refletida na capacidade de aderência destes parasitos em macrófagos murinos (Bisaggio, Peres-Sampaio et al. 2003).

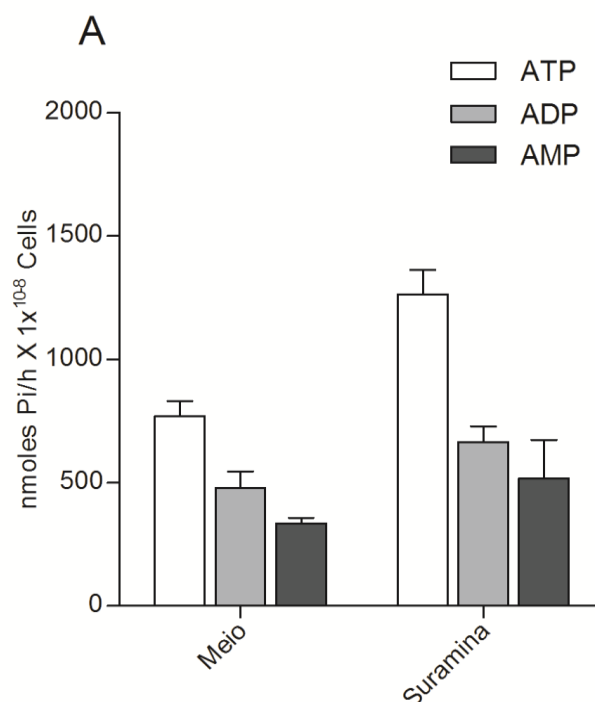


Figura 11. Atividade ecto-nucleotidásica de *L. infantum* de parasitos cultivados na presença de inibidor suramina por 72h. (A) Meio- Controle, Atividade ecto-nucleotidásica de parasitos cultivados em meio Schneider's Completo. Suramina - Atividade ecto-nucleotidásica de parasitos cultivados na ausência de suramina e na presença de 500µM de suramina. As barras representam as médias \pm SD de 4 experimentos independentes realizados em triplicata.

A fim de avaliar o papel da atividade ecto-nucleotidásica na adesão, os parasitos que tiveram sua atividade modulada positivamente pelo cultivo na presença de suramina, foram colocados em contato com células não fagocíticas, e sua capacidade de aderir a essas células foram avaliadas por contagem em microscopia óptica. A taxa de adesão dos parasitos cultivados na presença de suramina foi de $30,13 \pm 1,9$, 37% comparados ao controle cuja taxa de adesão fora de $18,86 \pm 3,5$ $p < 0,05$ (figura 12A). O número de células com parasitos aderidos foi de aproximadamente 39% quando os parasitos foram cultivados na presença de suramina, houve um aumento no número de parasitos aderidos em 100 células nos parasitos cultivados com suramina $34,31 \pm 1,9$ que apresentaram cerca de 75% mais parasitos aderidos quando comparado com o controle $19,33 \pm 4,1$ $p < 0,01$ (figura 12B).

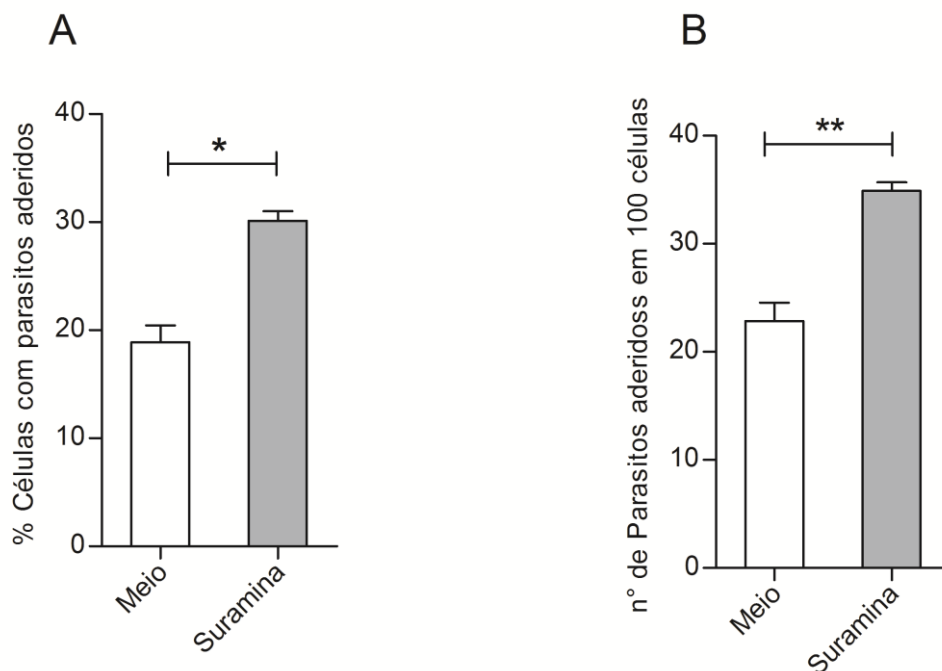


Figura 12. Influencia da na adesão de células não fagocíticas. (A) % de células com parasitos aderidos. (B) n° de parasitos aderidos por 100 células. Barras brancas fibroblastos aderidos com parasitos crescidos em meio Schneider's Completo. Barras cinzas fibroblastos aderidos com parasitos cultivados em meio com suramina 500 μ M. As barras representam a média \pm SD de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

6.8. Comparação da atividade ecto-nucleotidásica em diferentes cepas de *L. Infantum* isoladas de pacientes com LV

Para avaliar a presença de atividade ecto-nucleotidase em *L. infantum* nas cepas LVHSE 09, LVHSE 23, LVHSE 49 cepas isoladas de pacientes atendidos na clínica médica do no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. A capacidade hidrolítica das duas cepas LVHSE 09 e LVHSE 23 foram semelhantes, tanto para ATP, ADP e AMP (figura 13).

A figura13 mostra o perfil de hidrólise de nucleotídeos das cepas LVHSE 09, LVHSE 17, LVHSE 23 e LVHSE 49. A cepa LVHSE 49 apresentou o maior perfil de hidrólise de nucleotídeos di e trifosfatados, a degradação de ATP foi 42% maior, (798,12 \pm 79,14 nmoles Pi/h X 1x10⁻⁸ Células), 44% a mais para hidrólise de ADP (507,66 \pm 15,63 nmoles Pi/h X 1x10⁻⁸ Células), quando comparado a cepa LVHSE 17 que demonstrou menor taxa de hidrólise de nucleotídeos, apresentando uma taxa de

560,25 \pm 32,8 nmoles Pi/h X 1x10⁻⁸ Células para ATP, 351,17 \pm 19,51 nmoles Pi/h X 1x10⁻⁸ Células em relação a hidrólise de ADP e 241,01 \pm 73,4 nmoles.

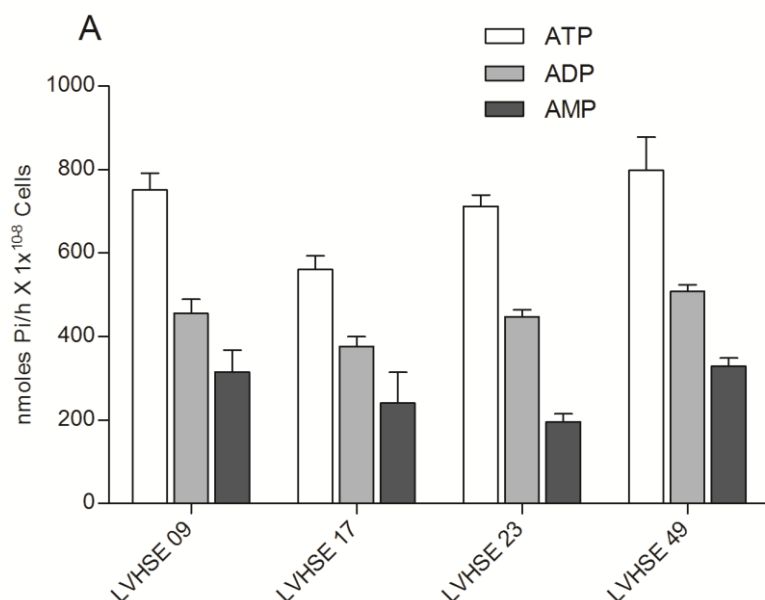


Figura 13: Comparação da atividade ecto-nucleotidásica (E-NTPDásica e 5' nucleotidásica) das cepas LVHSE 09, LVHSE 23, e LVHSE 49 com cepa LVHSE 17. 1x10⁸ promastigotas totais foram incubados 1h a 37°C com ATP, ADP e AMP e a atividade enzimática foi avaliada pela dosagem de fosfato inorgânico. As barras representam a média \pm SD de três experimentos independentes realizados em triplicata.

7. DISCUSSÃO

A maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos (figura 1A) está relacionada com a maior, capacidade de infectar macrófagos humanos (figura 2A) e aderir à célula do hospedeiro (figura 11 e 12). A habilidade de hidrolisar mais nucleotídeos apresentada pelos parasitos de *L. infantum* pode funcionar como um mecanismo de escape da defesa do hospedeiro, modulando a resposta imune.

Considerando que o ATPe é um potente sinalizador de perigo, e que sua ligação a receptores purinérgicos do tipo P2 estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias que ajudam na eliminação do parasito, tais como a ativação do inflamassoma (Coutinho-Silva and Ojcius 2012, Lima-Junior DS 2013).

Já a geração de adenosina no ambiente extracelular, por meio da hidrólise de ATPe, efetuado pelas enzimas NTPDases (figura 8 e 9), e 5' nucleotidases presentes na membrana de parasitos de *L. infantum* levam à ativação de receptores purinérgicos do tipo P1 que quando ativados desencadeiam vias de sinalização celulares relacionadas a modulação do sistema imune. A expressão de citocinas anti-inflamatórias parecem estar relacionadas com a sobrevivência do parasito, modulando a resposta imune, principalmente a resposta imune inata, favorecendo o estabelecimento da infecção (Ren, Teng et al. 2014, de Lima 2015).

Assim, alterações nas concentrações de nucleotídeos extracelulares, associados a uma rede de sinalização purinérgica presentes nas células do sistema imune, desempenham múltiplos papéis na imunoregulação do ambiente, tais como estimular a proliferação de linfócitos, a produção de ROS, NO, citocinas e secreção de quimiocinas (Di Virgilio 2007, Di Virgilio, Boeynaems et al. 2009). Parasitos que apresentaram maior atividade ecto-nucleotidásica (figura 1) tiveram maior capacidade de infectar macrófagos humanos (figura 2). Possivelmente a geração de adenosina no ambiente favoreça a sobrevivência do parasito, mostrando a importância das enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares durante a interação parasito-hospedeiro.

Muitos trabalhos apontam uma relação entre a capacidade de hidrólise de nucleotídeos extracelulares e a virulência e infectividade em *Leishmania sp* (de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, de Souza, de Assis et al. 2010, de Souza, Dos Santos et al. 2013).

Para determinar a participação da atividade ecto-nucleotidásica nos momentos iniciais da infecção, incubou-se previamente os parasitos com suramina, um inibidor da atividade NTPDásica, e observamos uma inibição de 70% a menos da atividade NTPDásica na hidrólise de ATP, de 48% na hidrólise de ADP e de 58% na hidrólise de AMP (figura 1 A) o que refletiu na capacidade infectiva desses parasitos quando colocados em contato com macrófagos humanos. Assim houve uma redução de 50% da taxa de infecção e também no número de amastigotas dentro de cada macrófago na condição em que os parasitos foram previamente incubados com suramina. Esses resultados corroboram com a ideia de que a atividade ecto-nucleotidásica desempenha um papel importante na interação parasito hospedeiro (Figura 2A e 2B) de *L. infantum* com macrófagos humanos. Juntamente com os neutrófilos, os macrófagos são as primeiras células a atuar na resposta imune inata contra o estabelecimento da infecção (Peters, Egen et al. 2008).

A inibição de cerca 70% da atividade ecto-nucleotidásica em relação a hidrólise de ATP desses parasitos pode modular a resposta imune inata nos primeiros momentos da infecção. O aumento da concentração de ATPe, pode ativar receptores purinérgicos do tipo P2Y, desencadeando vias pró-inflamatórias, como já foi demonstrado na infecção de macrófagos peritoneais por *E. coli* na qual a ativação dos receptores *Toll Like*, leva a mobilização de Ca^{2+} intracelular, levando a uma consequente liberação de ATPe, que estaria regulando positivamente a resposta imune inata (Ren, Teng et al. 2014).

A expressão de E-NTPDases e 5' nucleotidases podem estar relacionadas com maior virulência e capacidade infectiva, e que essa expressão é variável entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (Santos, Possa et al. 2009). Estudos realizados com tripanossomatídeos já demonstraram que há um aumento da expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de purinas tais como a 3' nucleotidase (Gottlieb 1985, Campbell TA 1991).

Dados da literatura demonstraram que *Leishmania donovani* possuem uma capacidade de reprogramação metabólica em resposta adaptativa ao estresse da ausência de purina, aumentando a expressão das enzimas relacionadas à via do metabolismo de purinas, para aumentar a eficiência da *via de salvação*. Além disso, este estudo sugere que a regulação do mecanismo molecular de aumento da

captação de purina é pós-transcricional através do aumento a expressão de enzimas da via de salvação (Carter, Yates et al. 2010, Martin, Yates et al. 2014).

A privação de purinas (figura 1 A) pode estar aumentando a expressão e a atividade das enzimas tais como E-NTPDases e 5' nucleotidase, na tentativa de adaptação as condições do meio, isto explicaria a maior capacidade hidrolítica de nucleotídeos de adenina de cerca de 65% maior nos parasitos cultivados em meio depletado de purina quando comparados com o controle (figura 1A). Uma vez que esses parasitos possuem em sua membrana essas enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos (figura 8), essas enzimas fazem parte da via de salvação de purinas, responsável pelo processo de captação de purinas para satisfazer suas necessidades de nucleotídeos. (Marr J. J. 1978).

Estudos *in vivo* realizados em camundongos infectados com *L. amazonensis*, apontam uma relação entre o aumento da concentração de adenosina nos momentos iniciais da infecção e o maior desenvolvimento da lesão e maior parasitismo. O bloqueio do receptor purinérgico de adenina A2B, levou a uma diminuição no tamanho da lesão e no parasitismo (de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008).

Nossos resultados corroboram com a teoria de que os parasitos poderiam super-expressar as enzimas do metabolismo de nucleotídeos, permitindo uma maior hidrólise de nucleotídeos e levando a um consequente aumento na concentração de adenosina, isto favoreceria o estabelecimento da infecção, explicado pela taxa de infecção dos parasitos crescidos em meio depletado de purina ser 25% maior e o maior número de amastigotas por macrófagos.

Em adição, outros trabalhos mostram que o estresse de purinas, é um dos fatores que desencadeiam a metaciclogênese em parasitas. Em *L. amazonensis* foi demonstrado que a ausência de nucleosídios, principalmente adenosina, controla a metaciclogênese tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, a adição de um antagonista do receptor da adenosina às culturas de *L. amazonensis* aumenta significativamente a metaciclogênese *in vitro*. (Serafim, Figueiredo et al. 2012). É possível que a maior capacidade infectiva observada nos parasitos de *L. infantum* cultivados em meio depletado de purina (Figura 2A e 2B) possa ter sido causada pela indução de metaciclogênese da forma promastigota para a forma promastigota metacíclica que é a forma infectiva destes parasitos, tal como acontece com *L. amazonensis*.

No entanto, são necessários estudos mais detalhados que analisem a natureza molecular dos fatores de estresse de purinas e indução da metaciclogênese para esclarecer lacunas da biologia desses parasitos. Além de uma análise de imagem de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal comparando a morfologia de parasitos crescidos com privação de purina e o controle para melhor discriminar a indução de metaciclogênese e a proporção dessa indução.

Resultados publicados por de Souza, de Assis et al. (2010), juntamente com outros trabalhos da literatura, têm implicado a expressão de ectonucleotidases no estabelecimento de infecção por *Leishmania*, correlacionando o tempo de cultivo e infectividade em *L. amazonenses*. Neste estudo feito por Souza et al (2010), promastigotas foram mantidas em cultura por muitas passagens e comparadas com culturas de primeira passagem, observando que as culturas de muitas passagens apresentaram uma capacidade infectiva reduzida, além de induzir lesões menores em camundongos. Contudo, parasitas em cultura de longo prazo apresentaram redução na atividade ecto-nucleotidásica.

Em contrapartida, parasitos submetidos à privação de purina, têm a capacidade de hidrólise de nucleotídeos aumentada. Dado o papel das enzimas E-NTPDases no aumento extracelular de AMP, e este posteriormente Sendo hidrolisado a adenosina pela ação da enzima 5'-ectonucleotidase a fim de gerar purinas para a via de salvação (Robson SC 2006), a oferta de adenosina no meio de cultura pode alterar expressão das E-NTPDases na superfície do parasita. Atividade NTPDásica e 5' nucleotidásica de promastigotas de *L. infantum* cultivados em meio suplementado com adenina foi significativamente diminuída tanto em relação a hidrólise de ATP e ADP, mas principalmente em relação à hidrólise de AMP que foi 5 vezes menor que o controle (figura 3A). Provavelmente em função da diminuição da expressão das enzimas, uma vez que a oferta de adenosina é elevada, sendo fácil a captação de purinas.

Quando analisamos a infectividade desses protozoários crescido em meio suplementado com adenosina, observamos que esses parasitos apresentaram uma redução na capacidade infectiva de cerca de 30% (figura 4A e 4B). Isto sugere a participação da atividade ecto-nucleotidásica na infecção de macrófagos humanos. Um estudo realizado por Gomes, de Carvalho et al. (2015) demonstram que em *L. amazonenses* há uma diminuição da expressão de E-NTPDases quando os

parasitos são crescidos em meio suplementado com adenosina, além de diminuir a taxa de sobrevivência dos parasitos em macrófagos murinos.

Recentemente foi demonstrado que em *L. amazonensis* a inibição da atividade de E-NTPDase reduz as taxas de sobrevivência do parasita em modelo murino, um efeito associado com o aumento da produção de NO de macrófagos. A atividade de E-NTPDase gera substrato para a produção de matriz extracelular. A adenosina, que se liga a receptores A2B e reduz IL-12 e TNF- α produzidos por macrófagos ativados, inibindo assim a produção de NO, provando que a atividade das E-NTPDases de *L. amazonensis* desempenha um papel relevante na sobrevivência do parasito dentro do macrófago, modulando a resposta desse macrófago e diminuindo a produção de NO, o que em última instância favorece a infecção (Gomes, de Carvalho et al. 2015).

Para avaliar se em *L. infantum* a atividade ecto-NTPDásica desempenha esse papel regulador na produção de óxido nítrico em macrófagos humanos, é necessário uma investigação utilizando uma técnica baseada na expressão das enzimas envolvidas no processo de produção de óxido nítrico, óxido nítrico sintetase iNOS, uma vez que a dosagem de nitrito pelo método de Griss é inviável para macrófagos humanos em função da baixa quantidade produzida.

Em *L. amazonenses*, parasitos que apresentam alta atividade Ecto-nucleotidásica tem uma maior taxa de sobrevivência em macrófagos ativados previamente com LPS / IFN- γ , por meio da inibição da produção de NO da célula hospedeira. Por outro lado, a taxa de sobrevivência do parasito é aumentada quando a atividade NTPDásica foi inibida, um efeito associado com o aumento da produção de NO de macrófagos. Atividade de E-NTPDásica contribui para geração de substrato adenosina no meio extracelular, se ligando a receptores purinérgicos do tipo A2B e reduzindo a produção de IL-12 e TNF- α por macrófagos ativados, inibindo assim a produção de NO (Gomes, de Carvalho et al. 2015).

Se tratando de protozoários unicelulares e por uma questão evolutiva a fim de garantir a sobrevivência, esses organismos respondem rapidamente à mudança de ambiente, tais como oferta de adenosina, o que pode causar uma diminuição na expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos celulares, de acordo com nossos dados (figura 1A e 3A). Possivelmente, a atividade ecto-

nucleotidásica pode estar relacionada à modulação da produção de NO nos macrófagos, tal como foi demonstrado em *L. amazonenses* por Gomes, de Carvalho et al. (2015). o que estaria aumentando a taxa de sobrevivência dos parasitos que apresentaram uma maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos em uma condição de depleção de purinas figura (1A, 2A e 2B), e diminuindo o número de parasitos infectantes e amastigotas por macrófago no caso de uma situação de meio suplementado de purina de figura (3A, 4A e 4B).

No entanto, mais estudos devem ser realizados na tentativa de desvendar o mecanismo de modulação da produção de NO, e avaliar a expressão das enzimas responsáveis pela produção de NO em macrófagos humanos iNOs e NO2.

O tratamento com nucleotídeos reduz o nível de infecção de *L. amazonensis*, através de um mecanismo que envolve a produção de ROS, NO e mediadores inflamatórios (Marques-da-Silva, Chaves et al. 2011). Em *T. cruzi*, o tratamento com ATP influencia na interação parasito hospedeiro aumentando a carga parasitária. Nosso estudo demonstra que o tratamento com ATP aumenta o número de macrófagos infectados (figura 5 A), que pode ser explicado uma vez que o ATP aumenta a capacidade de fagocitose de macrófagos, via ativação de receptores purinérgicos do tipo P2Y. A ativação desses receptores está relacionada a vias de síntese de NO, ativação do inflamassoma o que ajudaria no controle da infecção e eliminação do parasito (Coutinho-Silva and Ojcius 2012).

É provável que o ATP esteja aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos, por meio da ativação destes, como demonstrado por Ren e colaboradores (2014), no qual macrófagos murinos estimulados com ATP aumentaram a fagocitose de bactérias e se mostraram mais eficientes na eliminação das mesmas.

Já é sabido que a infecção por *L. amazonensis* ocasiona um aumento na expressão dos receptores purinérgicos P2X e P2Y em macrófagos, podendo ser um mecanismo de defesa do hospedeiro para debelar a infecção. Enquanto o ATP pode mediar respostas imunes através da ligação a P2X7 levando a ativação do inflamassoma, os nucleotídeos de pirimidinas se ligam a receptor P2Y contribuindo com a defesa do hospedeiro, estimulando a síntese de mediadores inflamatórios, ROS e NO (Mukbel R.M. (2007)).

Além disso, a infecção de macrófagos com *L. amazonensis* modula positivamente a expressão do receptor purinérgico P2X7 na membrana plasmática de macrófagos murinos, levando a um aumento de apoptose induzida por ATPe, favorecendo a eliminação do parasito. A ativação de P2X7 por ATP pode controlar o número de parasitos intracelulares em macrófagos, através de um mecanismo que independente da secreção de NO, que envolve produção de ROS e secreção de IL-1 β (Chaves, Torres-Santos et al. 2009). É possível que ativação de canais iônicos a partir de MMAPs (padrões moleculares associados a patógenos) em macrófagos, leve a uma modulação positiva da resposta imune inata culminando na montagem do inflamassoma induzindo a secreção de IL1- β (Marques-da-Silva, Chaves et al. 2011).

Alguns trabalhos descrevem a participação das enzimas E-NTPDases na virulência e infecção de *T. cruzi in vitro* (Bisaggio, Peres-Sampaio et al. 2003, Santos, Possa et al. 2009, Mariotini-Moura, Bastos et al. 2013). A partir dessa premissa, decidimos avaliar se o anticorpo anti E-NTPDase 1 de humano (CD39) poderia inibir a atividade E-NTPDásica dos promastigotas de *L. infantum* e sua participação na infecção de macrófagos humanos. Os parasitos foram previamente incubados com anti E-NTPDase-1 por 1h, e em seguida a atividade E-NTPDásica foi dosada. Observou-se que o anticorpo não inibe a capacidade de hidrólise dos parasitos, algumas hipóteses podem ser levantadas a partir deste resultado. O anticorpo pode estar se ligando a outra região da enzima que não o sítio ativo, não influenciando na catálise enzimática. Outra hipótese seria de que devido à presença da outra isoforma de 40KDa (figura 6A), provavelmente esta estaria compensando o bloqueio da isoforma de 70KDa sendo responsável pela atividade destes parasitos nessas condições, uma vez que o anticorpo anti E-NTPDases- 1 não é capaz de reconhecer a isoforma de 40KDa, só reconhecendo a isoforma de 70KDa (figura 6A).

Entretanto, a infecção “*in vitro*” de macrófagos humanos é reduzida cerca de 50% quando os parasitos são incubados previamente com o anticorpo (figura 7A), e o número de parasitos intracelulares também é reduzido (figura 7B), o anticorpo anti E-NTPDase1 de humano pode estar se ligando as E-NTPDases dos macrófagos, participando de alguma forma no processo infectivo. Esses resultado corrobora com trabalhos que avaliaram a participação da atividade NTPDásica de cepa Y de *T. cruzi in vivo e in vitro* demonstrado por Santos, Possa et al. (2009), no qual os

parasitos são incubados com anti TcE-NTPDase-1 recombinante, a atividade enzimática não é inibida, mas a infecção *in vitro* é reduzida, sugerindo a participação destas enzimas nos primeiros momentos da infecção.

De acordo com a literatura, uma análise do genoma de *L. infantum* (cepa JPCM5) aponta duas isoformas putativas de E-NTPDases nomeados como guanossina difosfatase (146079011 gi) e difosfatase nucleosídeo ou ATP difosfohidrolase (gi 146.081.775) (Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014). Há uma maior similaridade entre o único gene encontrado para E-NTPDase encontrado em *T. cruzi* E-NTPDase-1 (Fietto, DeMarco et al. 2004) e a guanossina difosfatase de *Leishmania*, classificadas e nomeadas por Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. (2014) como sendo Tripanossomatídeo E-NTPDase-1 (TpE-NTPDase-1) de aproximadamente 70 KDa, outra E-NTPDase de *Leishmania* foi nomeada Tripanossomatídeos TPDase-2 (TpE-NTPDase-2) de peso molecular de aproximadamente 40 KDa. Na tentativa de um consenso em relação a nomenclatura dessas enzimas, neste trabalho também foi utilizado os termos E-NTPDase-1 para isoforma de 70KDa e E-NTPDase-2 para isoforma de 40KDa.

A análise por western blotting de extrato bruto de *L. infantum*, utilizando anticorpos anti E-NTPDase 1 e 2 de humanos (Sigma) permitiu o reconhecimento de duas isoformas: uma de aproximadamente 70Kda referente a E-NTPDase 1 e outra menor de aproximadamente 40 KDa referente a E-NTPDase 2, como observado em outros trabalhos, provando a existência de E-NTPDases em extrato bruto de *L. infantum* (figura 8). Recentemente, um trabalho publicado por Vasconcelos (2014) foi capaz de imunodetectar uma isoforma de E-NTPDase de aproximadamente 40 KDa utilizando anticorpos policlonais anti E-NTPDase-2 recombinante em *L. infantum* (de Souza, Dos Santos et al. 2013, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

Nós demonstramos a presença de E-NTPDases na superfície de parasitos intactos por microscopia confocal (Figura 9). Essas enzimas possuem 5 regiões altamente conservadas responsáveis pela atividade ecto-nucleotidásica (Zimmermann 1999, Zimmermann 2000, Zimmermann 2001). Já fora demonstrado que um domínio antigênico altamente conservado da enzima E-NTPDase 1 de *L. amazonenses*, está associada com a progressão da doença em camundongos susceptíveis (Detoni, Fessel et al. 2013).

Os papéis fisiológicos das E-NTPDases não são totalmente conhecidos ainda; Entretanto, algumas funções têm sido postuladas, incluindo a participação na adesão celular, modulação de processos inflamatórios e na resposta imune (Zimmermann 1999). Em protozoários da família tripanossomatídae, estas enzimas parecem estar relacionadas à adesão e capacidade infectiva (Bisaggio, Peres-Sampaio et al. 2003, Mariotini-Moura, Bastos et al. 2013, Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

O processo de internalização de *T. cruzi* depende de enzimas cujos sítios ativos estão localizados tanto na face externa da membrana plasmática quanto no citoplasma (Souto-Padron, Campetella et al. 1990, Meirelles, Juliano et al. 1992, Colli 1993, Schenkman and Eichinger 1993, Schenkman, Eichinger et al. 1994, Scharfstein, Schmitz et al. 2000). As atividades dessas enzimas, referidas como ectoenzimas, podem ser medidas utilizando células intactas. (Furuya, Zhong et al. 1998, Meyer-Fernandes, Lanz-Mendoza et al. 2000).

A participação das ENTPDases no processo de adesão celular tem sido alvo de estudos. Macrófagos murinos previamente tratados com a enzima recombinante rLicE-NTPDase-2, e posteriormente colocados em contato com parasitos de *L. infantum* apresentaram redução na taxa de adesão e infecção (Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. 2014).

Corroborando com essa ideia, estudo realizado por Bisaggio, Peres-Sampaio et al. (2003) com *T. cruzi* sugerem o envolvimento da atividade E-NTPDásica na adesão e internalização dos parasitos em macrófagos murinos. A taxa de adesão foi reduzida em cerca de 63% quando a atividade NTPDásica foi inibida com suramina, e a internalização foi 50% menor nos parasitos pré-incubados com inibidor.

Deste modo, no presente estudo foi demonstrada a participação da atividade E-NTPDásica na adesão em células não fagocíticas e na infecção em macrófagos humanos. Parasitos cultivados na presença de suramina por 72h apresentaram um aumento na atividade E-NTPDásica em função do crescimento na presença do inibidor, que pode aumentar a expressão das enzimas envolvidas na hidrólise de nucleotídeos de adenosina. Em relação à toxicidade do inibidor às células, não houve efeito da suramina sobre a curva de crescimento dos parasitos (Figura 10). Entretanto dados publicados em 2003 por Bisaggio, Peres-Sampaio et al. (2003), no

qual o cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* com suramina levou a uma diminuição do número de células no quinto dia de cultura.

Os parasitos cultivados por 72 na presença do inibidor suramina apresentaram uma maior atividade ecto-nucleotidásica (figura 11 A) e foram 39% mais capazes de aderir às células não fagocíticas, além de um aumento de 34% no número total de parasitos aderidos em 100 células (figura 12 A e 12 B). Por outro lado, quando a atividade E- NTPDásica é inibida pela incubação prévia dos parasitos por 1 h com suramina, a taxa de infecção em macrófagos humanos é diminuída cerca de 50% (figura 2 A) e o número de parasitos intracelulares também foi reduzido (figura 2 B), sugerindo um importante papel das E-NTPDases no processo de adesão e penetração de *L. infantum* nas células do hospedeiro.

É provável que as enzimas E-NTPDases responsáveis pela hidrólise de ATP e ADP, e 5' nucleotidase pela hidrólise de AMP, participem nos momentos iniciais da infecção por *L. infantum*, na qual as E-NTPDases poderiam se ligar a algum sítio específico na membrana, facilitando adesão dos parasitos à célula hospedeira.

Vasconcellos, Mariotini-Moura et al. (2014) apontam a possível existência de sítios de ligação (por exemplo, receptores) para E-NTPDases de *L. infantum* na membrana de macrófagos murinos, que pode facilitar a aderência e a infecção do parasito. Essas conclusões foram tiradas através de um ensaio utilizando uma forma recombinante da rLicE-NTPDase2, que possivelmente estaria competindo com a interação da enzima presente na membrana do parasito com sítios presentes no macrófago. Outros trabalhos também apontam a participação das E-NTPDases na adesão e infecção de *T. cruzi* em células VERO, utilizando diferentes concentrações da proteína recombinante rTcE-NTPDase num ensaio de competição *in vitro*, no qual foi observado que na presença da proteína recombinante levou a uma inibição da adesão *in vitro* (Mariotini-Moura, Bastos et al. 2013).

Em *Leishmania*, já foi proposto por Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. (2001) que um aumento na atividade ecto-nucleotidásica aumentaria a produção de adenosina, o que consequentemente ajudaria no estabelecimento da infecção por meio de ação imunossupressora. Cepas infecciosas de *L. amazonensis* apresentaram uma maior atividade ecto-nucleotidásica em comparação com cepas avirulentas e mostram ser mais efetivas no estabelecimento da infecção em modelo

murino (Berredo-Pinho, Peres-Sampaio et al. 2001, de Almeida Marques-da-Silva, de Oliveira et al. 2008, de Souza, de Assis et al. 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o importante papel das enzimas do metabolismo de nucleotídeos extracelulares e a capacidade de hidrólise desses nucleotídeos por promastigotas de *L. infantum* na interação parasito hospedeiro, especificamente nos momentos iniciais da infecção de macrófagos humanos, e na aderência desses parasitos as células do hospedeiro.

8. CONCLUSÕES

1. A atividade ecto-nucleotidásica de parasitos *L. infantum* tem uma relação com a infectividade e adesão em macrófagos humanos.
2. Condições que interferem negativamente na atividade das E-NTPDases (Suramina, Adenosina) reduzem a infecção em macrófagos humanos.
3. O aumento da atividade das E-NTPDases pelo crescimento dos parasitos com depleção de purinas aumenta a infecção de macrófagos.
4. A atividade ecto-nucleotidásica e as enzimas E-NTPDases podem participar na adesão de promastigotas de *L. infantum* em células não fagocíticas.
5. E-NTPDase de *L. infantum* foi identificada por imunoblotting com anticorpo Anti E-NTPDase 1 humana como uma isoforma de 70 KDa no extrato bruto de *L. infantum* e também na superfície de parasitos intactos por microscopia confocal.
6. Anticorpo Anti-E-NTPDase 2 Humana é capaz de reconhecer duas isoformas uma de 70 KDa e outra de 40 KDa no extrato bruto de *L. infantum* e também na superfície de parasitos intactos.
7. Outras cepas isoladas de pacientes com LV apresentam diferentes taxas de hidrólise de nucleotídeos.

8.1. CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho conclui que a capacidade de hidrólise de nucleotídeos por promastigotas de *L. infantum* pode ser modulada de acordo com a oferta ou escassez de adenosina no meio de cultura. Essa modulação influencia na capacidade infectiva de *L. infantum in vitro*, essa habilidade pode estar envolvida com a capacidade infectiva desses parasitos, funcionando como um mecanismo do parasito para evadir o sistema imune do hospedeiro.

9. PERSPECTIVAS

- 1- Verificar a modulação de vias intracelulares de sinalização pelos nucleotídeos ATP e adenosina.
- 2- Analisar a modulação de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, TNF- α .
- 3- Em que receptor ao parasitos estão aderindo, utilizar inibidores de receptores purinérgicos, ensaio de adesão e infecção.
- 4- Verificar se as diferentes NTPDásica dos diferentes cepas de *L. infantum* se associam a uma diferença nas suas capacidades infectivas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar, J., I. D. Vélez, et al. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." *PLoS One* **7**(5): e35671.
- Ansari, N. A., S. Saluja and P. Salotra (2006). "Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar." *Clin Immunol* **119**(3): 339-345.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., Hasko, G. (2013). "Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine." *Nat. Rev. Cancer* **13**: 842-857.
- Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi and T. Takeuchi (1995). "Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*." *J Biol Chem* **270**(19): 11391-11397.
- Badaró, R., T. C. Jones, et al. (1986). "New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis." *J Infect Dis* **154**(6): 1003-1011.
- Badaró, R., T. C. Jones, et al. (1986). "A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil." *J Infect Dis* **154**(4): 639-649.
- Barros, F. S., L. F. De Menezes, A. A. Pinheiro, E. F. Silva, A. H. Lopes, W. De Souza and J. R. Meyer-Fernandes (2000). "Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*." *Arch Biochem Biophys* **375**(2): 304-314.
- Basu, M. K. a. M. R. (2005). "Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence." *Crit Rev Microbiol* **31**(3): 145-154.
- Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." *Int J Parasitol* **37**(10): 1097-1106.
- Belkaid, Y., E. Von Stebut, et al. (2002). "CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." *J Immunol Cell Biol* **168**(8): 3992-4000.
- Belosevic M., F. D. S., Van der Meide P.H., Slayter M.V. & Nacy C.A. (1989). "Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*." *J.Immunol.* **143**: 266-274.
- Bermudes, D., K. R. Peck, M. A. Afifi, C. J. Beckers and K. A. Joiner (1994). "Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*." *J Biol Chem* **269**(46): 29252-29260.
- Berreto-Pinho, M., C. E. Peres-Sampaio, P. P. Chrispim, R. Belmont-Firpo, A. P. Lemos, A. Martiny, M. A. Vannier-Santos and J. R. Meyer-Fernandes (2001). "A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence." *Arch Biochem Biophys* **391**(1): 16-24.
- Bisaggio, D. F., C. E. Peres-Sampaio, J. R. Meyer-Fernandes and T. Souto-Padron (2003). "Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction." *Parasitol Res* **91**(4): 273-282.
- Bours, M. J., E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein and P. C. Dagnelie (2006). "Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation." *Pharmacol Ther* **112**(2): 358-404.

Burnstock, G. (2014). "Purinergic signalling: from discovery to current developments." Exp. Physiol **99**: 16-34.

Campbell TA, Z. G., Neubert TA, Sacchi JB Jr, Gottlieb M (1991). "Purification and characterization of the 3'-nucleotidase/nuclease from promastigotes of *Leishmania donovani* " Mol Biochem Parasitol **47**(1): 109-117.

Carter, N. S., P. A. Yates, S. K. Gessford, S. R. Galagan, S. M. Landfear and B. Ullman (2010). "Adaptive responses to purine starvation in *Leishmania donovani*." Mol Microbiol **78**(1): 92-107.
 Chaves, S. P., E. C. Torres-Santos, C. Marques, V. R. Figliuolo, P. M. Persechini, R. Coutinho-Silva and B. Rossi-Bergmann (2009). "Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination." Microbes Infect **11**(10-11): 842-849.
 Chen, J. F., Eltzschig, H.K., Fredholm, B.B. (2013). "Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? ." Drug Discov. Nat. Rev. **12**(265-286).

Coimbra, E. S., S. C. Goncalves-da-Costa, S. Corte-Real, F. G. De Freitas, A. C. Durao, C. S. Souza, M. I. Silva-Santos and E. G. Vasconcelos (2002). "Characterization and cytochemical localization of an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes." Parasitology **124**(Pt 2): 137-143.

Colli, W. (1993). "Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*." FASEB J **7**(13): 1257-1264.

Collins, D. R. R., K.; Keus, K.; Melaku, Y.; Kipngetich, S.; Davies, C. (2004). "Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan." Clin Infect Dis **38**(5): 612-619.

Correa G., M. d. S. C., de Abreu Moreira-Souza A.C., Vommaro R.C. , Coutinho-Silva R. . (2010). "Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages." Microbes Infect. **12** . 497e504.

Costa, C. H., *et al.* (2000). "Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*." Infect Dis **182**(3): 997-1000.

Costa, C. H., C. M. Tapety and G. L. Werneck (2007). "[Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial]." Rev Soc Bras Med Trop **40**(4): 415-419.

Costa, C. H. e. *a.* (2002). "Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*." Am J Trop Med Hyg **66**(4): 334-337.

Costa, C. H. e. *a.* (2005). " Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis." Ann Trop Med Parasitol **99**(3): 229-236.
 Coutinho-Silva, R. and D. M. Ojcius (2012). "Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites." Microbes Infect **14**(14): 1271-1277.

Cunha, L. C. S. (2010). Imunolocalização da Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase 1 (NTPDase-1) de *Trypanosoma cruzi* Master Scientiae, Universidade Federal de Viçosa.

de Aguiar Matos, J. A., F. P. Borges, T. Tasca, M. R. Bogo, G. A. De Carli, M. da Graca Fauth, R. D. Dias and C. D. Bonan (2001). "Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in *Trichomonas vaginalis*." Int J Parasitol **31**(8): 770-775.

de Almeida Marques-da-Silva, E., J. C. de Oliveira, A. B. Figueiredo, D. de Souza Lima Junior, C. M. Carneiro, J. L. Rangel Fietto and L. C. Crocco Afonso (2008). "Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection." Microbes Infect **10**(8): 850-857.

de Lima, M. H. F. P., Vanessa Carregaro (2015). Papel do receptor de adenosina A2A (A2AR) no controle da resposta inflamatória durante a infecção experimental por Leishmania infantum. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

de Souza EP, P. A., Machado FCS, Melo MF, Souto-Padron T, et al. (2001). " Occurrence of Leishmania donovani parasitemia in plasma of infected hamsters. ." Acta Trop **80**: 69–75.

de Souza Leite, M., R. Thomaz, F. V. Fonseca, R. Panizzutti, A. E. Vercesi and J. R. Meyer-Fernandes (2007). "Trypanosoma brucei brucei: biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities." Exp Parasitol **115**(4): 315-323.

de Souza, M. C., E. A. de Assis, R. S. Gomes, A. Marques da Silva Ede, M. N. Melo, J. L. Fietto and L. C. Afonso (2010). "The influence of ecto-nucleotidases on Leishmania amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice." Acta Trop **115**(3): 262-269.

de Souza, R. F., Y. L. Dos Santos, R. de Souza Vasconcellos, L. Borges-Pereira, I. S. Caldas, M. R. de Almeida, M. T. Bahia and J. L. Fietto (2013). "Recombinant Leishmania (Leishmania) infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis." Acta Trop **125**(1): 60-66.

DeMarco, R., A. T. Kowaltowski, R. A. Mortara and S. Verjovski-Almeida (2003). "Molecular characterization and immunolocalization of Schistosoma mansoni ATP-diphosphohydrolase." Biochem Biophys Res Commun **307**(4): 831-838.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives" Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.

Detoni, M. L., M. R. Fessel, A. C. Maia, G. N. Porcino, L. R. Quellis, P. Faria-Pinto, M. J. Marques, M. A. Juliano, L. Juliano, V. A. Diniz, S. Corte-Real, S. C. Goncalves-da-Costa, C. S. Souza and E. G. Vasconcelos (2013). "An antigenic domain of the Leishmania amazonensis nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice." Parasitol Res **112**(8): 2773-2782.

Di Virgilio, F. (2006). "Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells." Purinergic Signalling **v.1**: p.205-209.

Di Virgilio, F. (2007). "Purinergic signalling in the immune system. A brief update." Purinergic Signal **3**(1-2): 1-3.

Di Virgilio, F. and (2006). "Purinergic mechanism in the immune system: a signal of danger for dendritic cells." Purinergic Signalling **1**: 205-209

Di Virgilio, F., J. M. Boeynaems and S. C. Robson (2009). "Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity." Curr Opin Pharmacol **9**(4): 507-513.

Di Virgilio, F. and M. Vuerich (2015). "Purinergic signaling in the immune system." Auton Neurosci.

Diefenbach A, S. H., Rollinghoff M, Yokoyama WM, Bogdan C (1999). "Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity." Science **284**: 951-955.

Dombrowski, K. E., Y. Ke, K. A. Brewer and J. A. Kapp (1998). "Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function." Immunol Rev **161**: 111-118.

Dorsam, R. T., Kunapuli, S.P. (2004). " Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation." J. Clin. Invest. **113**: 340-345.

dos Passos Lemos, A., A. A. de Sa Pinheiro, M. de Berredo-Pinho, L. Fonseca de Souza, C. M. Motta, W. de Souza and R. Meyer-Fernandes (2002). "Ectonucleotide diphosphohydrolase activity in *Crithidia deanei*." Parasitol Res **88**(10): 905-911.

Dutra P. M. L., D. F. A., Santos M. A. A. , Rodrigues C. O., Romeiro A. , Attias M., De Souza W. , Lopes A. H. C. S., and Meyer-Fernandes J. R. (2001). "Secreted Phosphatase Activities in Trypanosomatid Parasites of Plants Modulated by Platelet-Activating Factor." PHYTOPATHOLOGY **Vol. 91**(4): 408-414.

Dwyer, K., S. Deaglio, W. Gao, D. Friedman, T. Strom and S. Robson (2007). "CD39 and control of cellular immune responses." Purinergic Signalling **3**: 171-180.

el Kouni, M. H. (2003). "Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites." Pharmacol Ther **99**(3): 283-309.

Enjoji, K., J. Seigny, Y. Lin, P. S. Frenette, P. D. Christie, J. S. Esch, 2nd, M. Imai, J. M. Edelberg, H. Rayburn, M. Lech, D. L. Beeler, E. Csizmadia, D. D. Wagner, S. C. Robson and R. D. Rosenberg (1999). "Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation." Nat Med **5**(9): 1010-1017.

Faria MS, R. F., Lima AP. (2012). "Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? ." Res. J. Parasitol. **930257**.

Fietto, J. L., R. DeMarco, I. P. Nascimento, I. M. Castro, T. M. Carvalho, W. de Souza, M. T. Bahia, M. J. Alves and S. Verjovski-Almeida (2004). "Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun **316**(2): 454-460.

Flandin JF, C. F., Descoteaux A. (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferongamma- primed macrophages." Eur. J. Immunol. **36**(2): 411-420.

Furuya, T., L. Zhong, J. R. Meyer-Fernandes, H. G. Lu, S. N. Moreno and R. Docampo (1998). "Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages." Mol Biochem Parasitol **92**(2): 339-348.

Gardinassi, L. G., V. Dotz, et al. (2014). ""Clinical severity of visceral leishmaniasis is associated with changes in immunoglobulin g fc N-glycosylation." MBio **5**(6): e01844.

Gomes, R. S., L. C. de Carvalho, R. de Souza Vasconcellos, J. L. Fietto and L. C. Afonso (2015). "E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation." Microbes Infect **17**(4): 295-303.

Gottlieb, M. (1985). "Enzyme Regulation in a Trypanosomatid: Effect of Purine Starvation on Levels of 3'-Nucleotidase Activity." SCIENCE **227**: 72-74.

Gounaris, K. (2002). "Nucleotidase cascades are catalyzed by secreted proteins of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*." Infect Immun **70**(9): 4917-4924.

Hailu A., v. B. D., Knol G. J., BerheN., Miedema F., Kager P. A., (2005). "T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*." Clinical Immunology **117**(2): 182–191.

Handa, M. and G. Guidotti (1996). "Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*)." Biochem Biophys Res Commun **218**(3): 916-923.

Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-1199.

Hunsucker, S. A. M., B.S.; Spychala, J. (2005). "The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism." Pharmacology & Therapeutics **107**: 1-30.

Idzko, M., Ferrari, D., Eltzschig, H.K., 2014. (2014). "Nucleotide signalling during inflammation." Nature **509**(310-317).

Ivanenkov, V. V., D. M. Murphy-Piedmonte and T. L. Kirley (2003). "Bacterial expression, characterization, and disulfide bond determination of soluble human NTPDase6 (CD39L2) nucleotidase: implications for structure and function." Biochemistry **42**(40): 11726-11735.

Jeronimo, S. M., P. Duggal, R. F. Braz, C. Cheng, G. R. Monteiro, E. T. Nascimento, D. R. Martins, T. M. Karplus, M. F. Ximenes, C. C. Oliveira, V. G. Pinheiro, W. Pereira, J. M. Peralta, J. Sousa, I. M. Medeiros, R. D. Pearsoni, T. L. Burns, E. W. Pugh and M. E. Wilson (2004). "An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil." Scand J Infect Dis **36**(6-7): 443-449.

Jijon, H. B., J. Walker, F. Hoentjen, H. Diaz, J. Ewaschuk, C. Jobin and K. L. Madsen (2005). "Adenosine is a negative regulator of NF-kappaB and MAPK signaling in human intestinal epithelial cells." Cell Immunol **237**(2): 86-95.

Junger, W. G. (2011). "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." Nat. Rev. Immunol. **11**(201-212).

Kawashima, Y. N., T.; Ninomiya, H. (2000). "Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells." Blood **96**: 2157-2162.

Khakh, B. S., North, R.A. (2006). "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease." Nature **442**: 527-532.

Kukulski, F., F. Ben Yebdri, J. Lecka, G. Kauffenstein, S. A. Levesque, M. Martin-Satue and J. Sevigny (2009). "Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration." Cytokine **46**(2): 166-170.

Kumar R, N. S. (2012). "Immunobiology of visceral leishmaniasis." Front. Immunol **3**: 251.

Lainson, R. e. R., E.F. (2005). "Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(8): 811-827.

Labiberte, J. F. and A. R. Beaudoin (1983). "Sequential hydrolysis of the gamma- and beta-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas." Biochim Biophys Acta **742**(1): 9-15.

Langston HP, K. Y., Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. (2003 Mar 15). "Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP." J Immunol. **170**(6): 2962-2970.

Leal, D. B. R., C. A. Strecher, T. N. Neu, F. P. Bittencourt, C. A. M. Leal, J. E. P. Da Silva, V. M. Morsch and M. R. C. Schetinger (2005). "Caracterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.15) activity in human lymphocytes. ." Biochimica et Biophysica Acta **1721**(1-3): 9-15.

Lee, J. H. and D. C. Marcus (2008). "Purinergic signaling in the inner ear." Hear Res **235**(1-2): 1-7.
 Lees, M. P., S. J. Fuller, R. McLeod, N. R. Boulter, C. M. Miller, A. M. Zakrzewski, E. J. Mui, W. H. Witola, J. J. Coyne, A. C. Hargrave, S. E. Jamieson, J. M. Blackwell, J. S. Wiley and N. C. Smith (2010). "P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, Toxoplasma gondii, by human and murine macrophages." J Immunol **184**(12): 7040-7046.

Liew, F. Y., C. Parkinson, et al. (1990). " "Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis."." Immunology **90**(4): 570-573.

Liew, F. Y., X. Q. Wei, et al. (1997). " "Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections."." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1359): 1311-1315.

Lima-Junior DS, C. D., Carregaro V, Cunha LD, Silva AL, Mineo TW, Gutierrez FR, Bellio M, Bortoluci KR, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni DS. (2013). "Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania." Nat Med.Jul;19(7) **19**(7): 909-915.

Lukes, J., I. L. Mauricio, G. Schonian, J. C. Dujardin, K. Soteriadou, J. P. Dedet, K. Kuhls, K. W. Tintaya, M. Jirku, E. Chocholova, C. Haralambous, F. Pratlong, M. Obornik, A. Horak, F. J. Ayala and M. A. Miles (2007). "Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9375-9380.

Maioli, T. U., E. Takane, R. M. Arantes, J. L. Fietto and L. C. Afonso (2004). "Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice." Parasitol Res **94**(3): 207-212.

Mariotini-Moura, C., M. S. Bastos, F. F. de Castro, M. L. Trindade, R. de Souza Vasconcellos, M. A. Neves-do-Valle, B. P. Moreira, R. de Freitas Santos, C. M. de Oliveira, L. C. Cunha, X. M. Souto, G. C. Bressan, A. Silva-Junior, M. M. Baqui, M. T. Bahia, M. R. de Almeida, J. R. Meyer-Fernandes and J. L. Fietto (2013). "Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion." Acta Trop **130C**: 140-147.

Marques-da-Silva, C., M. M. Chaves, J. C. Rodrigues, S. Corte-Real, R. Coutinho-Silva and P. M. Persechini (2011). "Differential modulation of ATP-induced P2X7-associated permeabilities to

cations and anions of macrophages by infection with *Leishmania amazonensis*." PLoS One **6**(9): e25356.

Marr J. J., R. L. B. a. D. J. N. (1978). "Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*." Biochim Biophys Acta **v.544**(n.2): p.360-371.

Martin, J. L., P. A. Yates, R. Soysa, J. F. Alfaro, F. Yang, K. E. Burnum-Johnson, V. A. Petyuk, K. K. Weitz, D. G. Camp, 2nd, R. D. Smith, P. A. Wilmarth, L. L. David, G. Ramasamy, P. J. Myler and N. S. Carter (2014). "Metabolic reprogramming during purine stress in the protozoan pathogen *Leishmania donovani*." PLoS Pathog **10**(2): e1003938.

McCall, L. I., W. W. Zhang, et al. (2013). ""Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease."." PLoS Pathog **9**(1): e1003053.

Meirelles, M. N., L. Juliano, E. Carmona, S. G. Silva, E. M. Costa, A. C. Murta and J. Scharfstein (1992). "Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro." Mol Biochem Parasitol **52**(2): 175-184.

Meyer-Fernandes, J. R., P. M. Dutra, C. O. Rodrigues, J. Saad-Nehme and A. H. Lopes (1997). "Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*." Arch Biochem Biophys **341**(1): 40-46.

Meyer-Fernandes, J. R., H. Lanz-Mendoza, K. C. Gondim, E. Willott and M. A. Wells (2000). "Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta*." Arch Biochem Biophys **382**(1): 152-159.

Minero, M. A., M. Chinchilla, O. M. Guerrero and A. Castro (2004). "Infección de fibroblastos de piel de animales con distinto grado de susceptibilidad a *Leishmania infantum* y *L. mexicana* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)." INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION **52**(1): 261-268.

Mizumoto, N., T. Kumamoto, S. C. Robson, J. Seigny, H. Matsue, K. Enjyoji and A. Takashima (2002). "CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness." Nat Med **8**(4): 358-365.

Mukbel R.M., P. J. C., Gibson K., Ghosh M., Petersen C., Jones D.E. ((2007)). "Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide." Am. J. Trop. Med **76**: 669e 675.

Mukherjee AK, G. G., Adhikari A et al. (2012). "Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. ." Int. Immunopharmacol **12**(4): 565-572.

Murphy-Piedmonte, D. M., P. A. Crawford and T. L. Kirley (2005). "Bacterial expression, folding, purification and characterization of soluble NTPDase5 (CD39L4) ecto-nucleotidase." Biochim Biophys Acta **1747**(2): 251-259.

Murray, H. W., B. Y. Rubin, et al. (1983). ""Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine." " J Clin Invest **72**(4): 1506-1510.

Murray, H. W. J. D. B., et al. (2005). " "Advances in leishmaniasis."." Lancet **(9496)**(366): 1561-

1577.

Nemeth, Z. H., C. S. Lutz, B. Csoka, E. A. Deitch, S. J. Leibovich, W. C. Gause, M. Tone, P. Pacher, E. S. Vizi and G. Hasko (2005). "Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism." *J Immunol* **175**(12): 8260-8270.

North, R. A., Surprenant, A., (2000). "Pharmacology of cloned P2X receptors." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **40**(563-580).

Nylen, S., R. Maurya, L. Eidsmo, K. D. Manandhar, S. Sundar and D. Sacks (2007). "Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis." *J Exp Med* **204**(4): 805-817.

Osorio, E. Y., B. L. Travi, et al. (2014). "Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis." *PLoS Pathog* **10**(6): e1004165.

Paletta-Silva, R. and J. R. Meyer-Fernandes (2012). "Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: the possible role of ectonucleotidases." *J Trop Med* **2012**: 650874.

Paun A, B. R., Joshi T, Pitha PM, Stager S. (2011). "Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection." *PLoS Pathog* **7**(1): e1001246.

Pearson, R. D. a. R. T. S. (1981). "Phagocytosis and killing of the protozoan Leishmania donovani by human polymorphonuclear leukocytes." *J Immunol* **127**(3): 1438-1443.

Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." *Science* **321**(5891): 970-974.

Peters NC, K. N., Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, et al. (2009). "Vector transmission of Leishmania abrogates vaccine-induced protective immunity." *PLoS Pathog* **5**: e1000484.

Pinheiro, C. M., E. S. Martins-Duarte, R. B. Ferraro, A. L. Fonseca de Souza, M. T. Gomes, A. H. Lopes, M. A. Vannier-Santos, A. L. Santos and J. R. Meyer-Fernandes (2006). "Leishmania amazonensis: Biological and biochemical characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities." *Exp Parasitol* **114**(1): 16-25.

Pizzirani, C., D. Ferrari, P. Chiozzi, E. Adinolfi, D. Sandona, E. Savaglio and F. Di Virgilio (2007). "Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells." *Blood* **109**(9): 3856-3864.

Rahman, K. M. e. I., N. (1983). "Resurgence of visceral leishmaniasis in Bangladesh. ." *Bull World Health Organ* **61**(1): 113-116.

Ren, H., Y. Teng, B. Tan, X. Zhang, W. Jiang, M. Liu, W. Jiang, B. Du and M. Qian (2014). "Toll-like receptor-triggered calcium mobilization protects mice against bacterial infection through extracellular ATP release." *Infect Immun* **82**(12): 5076-5085.

Resta, R. Y., Y.; Thompson, L.F. (1998). "Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73." *Immunological Reviews* **161**: 95-109.

Ribeiro-Gomes FL, P. N., Debrabant A, Sacks DL (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early antiLeishmania response." PLoS Pathog **8**: e1002536.

Robson SC, S. J., Zimmermann H. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. ." Purinergic Signal **2**: 409e430.

Robson SC, S. J., Zimmermann H. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. ." Purinergic Signalling **30**: 2:409.

Sacks, D. a. N. N.-T. (2002). ""The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice." " Nat Rev Immunol **2**(11): 845-858.

Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. **3**: 18-49.

Sansom, F. M., H. J. Newton, S. Crikis, N. P. Cianciotto, P. J. Cowan, A. J. d'Apice and E. L. Hartland (2007). "A bacterial ecto-triphosphate diphosphohydrolase similar to human CD39 is essential for intracellular multiplication of Legionella pneumophila." Cell Microbiol **9**(8): 1922-1935.

Sansom, F. M., S. C. Robson and E. L. Hartland (2008). "Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions." Microbiol Mol Biol Rev **72**(4): 765-781, Table of Contents.

Santos, R. F., M. A. Possa, M. S. Bastos, P. M. Guedes, M. R. Almeida, R. Demarco, S. Verjovski-Almeida, M. T. Bahia and J. L. Fietto (2009). "Influence of Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on Trypanosoma cruzi infectivity and virulence." PLoS Negl Trop Dis **3**(3): e387.

Scharfstein, J., V. Schmitz, V. Morandi, M. M. Capella, A. P. Lima, A. Morrot, L. Juliano and W. Muller-Esterl (2000). "Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors." J Exp Med **192**(9): 1289-1300.

Scharton-Kersten, T., L. C. Afonso, et al. (1995). ""IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis."." J Immunol **154**(10): 5320-5330.

Schenkman, S. and D. Eichinger (1993). "Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion." Parasitol Today **9**(6): 218-222.

Schenkman, S., D. Eichinger, M. E. Pereira and V. Nussenzweig (1994). "Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase." Annu Rev Microbiol **48**: 499-523.

Serafim, T. D., A. B. Figueiredo, P. A. Costa, E. A. Marques-da-Silva, R. Goncalves, S. A. de Moura, N. F. Gontijo, S. M. da Silva, M. S. Michalick, J. R. Meyer-Fernandes, R. P. de Carvalho, S. R. Uliana, J. L. Fietto and L. C. Afonso (2012). "Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines." PLoS Negl Trop Dis **6**(9): e1833.

Silverman, J. A., H. Qi, A. Riehl, C. Beckers, V. Nakaar and K. A. Joiner (1998). "Induced activation of the Toxoplasma gondii nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells." J Biol Chem **273**(20): 12352-12359.

Singh OP, G. K., Kumar R, Nylen S, Jones SL, et al. (2012). "Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. ." Clin Vaccine Immunol **19**(961-966).

Smith, T. M., Jr., T. L. Kirley and T. M. Hennessey (1997). "A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle." Arch Biochem Biophys **337**(2): 351-359.

Smith, T. M. and T. L. Kirley (1999). "Site-directed mutagenesis of a human brain ecto-apyrase: evidence that the E-type ATPases are related to the actin/heat shock 70/sugar kinase superfamily." Biochemistry **38**(1): 321-328.

Souto-Padron, T., O. E. Campetella, J. J. Cazzulo and W. de Souza (1990). "Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction." J Cell Sci **96 (Pt 3)**: 485-490.

Spooner R. , Y. O. (2011). "The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation." Int. J. Mol. Sci. **12**: 334e352.

Stanley AC, E. C. (2007). "Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis." Immunol Cell Biol **85**(138-147).

Strater, N. (2006). "Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships." Purinergic Signalling **2**: 343-350.

Taussky, H. H. and E. Shorr (1953). "A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus." J Biol Chem **202**(2): 675-685.

Thakur, C. P. (1984). "Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar kala-azar (including post kala-azar dermal leishmaniasis)." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(3): 391-398.

Thalhofer, C. J., Y. Chen, et al. (2011). ""Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi."." Infection and immunity **79**(1): 108-117

Tripathi P. , S. V., and Naik S. , (2007). " "Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm". " FEMS Immunology and Medical Microbiology **51**(2): 229–242.

Vasconcellos, R. D. S., C. Mariotini-Moura, R. S. Gomes, T. D. Serafim, R. Firmino, M. Silva e Bastos, F. F. de Castro, C. M. de Oliveira, L. Borges-Pereira, A. de Souza, R. F. de Souza, G. A. T. Gómez, A. C. Pinheiro, T. E. F. Maciel, A. Silva-Júnior, G. C. Bressan, M. Almeida, M. M. A. Baqui, C. C. Afonso Lí and J. L. R. Fietto (2014). "*Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs." PLoS Negl Trop Dis **8**(11).

Vasconcellos, R. D. S., C. Mariotini-Moura, R. S. Gomes, T. D. Serafim, R. d. C. Firmino, M. Silva e Bastos, F. F. de Castro, C. M. de Oliveira, L. Borges-Pereira, A. C. A. de Souza, R. F. de Souza, G. A. T. Gómez, A. d. C. Pinheiro, T. E. F. Maciel, A. Silva-Júnior, G. C. Bressan, M. R. Almeida, M. M. A. Baqui, L. C. C. Afonso and J. L. R. Fietto (2014). "*Leishmania infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs." PLoS Neglected Tropical Diseases **8**(11): e3309.

Verma S, K. R., Katara GK, Singh LC, Negi NS, et al.. (2010) "Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis." PLoS ONE **5**, e10107 DOI: doi:10.1371/journal.pone.0010107.

W.H.O (2002). "World Health Organization. Strategic Directions for Research. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends." Geneva, Switzerland.

W.H.O. (2015, Updated February 2015

). "World Health Organization : "Leishmaniasis". Retrieved julho, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Werneck, G. L. (2010). "Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil." Cad. Saúde Pública, , 26(4):644-645, abr, 2010 **26**(4): 644-645.

Yegutkin, G. G. (2008). "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 673-694.

Yegutkin, G. G., 2014. (2014). " Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities." Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **49**: 473-497.

Zimmermann, H. (1999). "Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function." Trends Pharmacol Sci **20**(6): 231-236.

Zimmermann, H. (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.

Zimmermann, H. (2001). "Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature." Drug Dev **52**: 44-56.

Zimmermann, H. and N. Braun (1996). "Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system." J Auton Pharmacol **16**(6): 397-400.